

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



20.08.97

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年10月 7日

REC'D 05 SEP 1997

WIPO PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第266431号

出 願 人

Applicant (s):

鐘淵化学工業株式会社

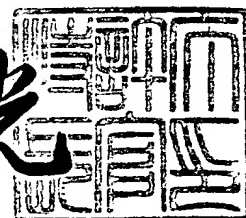
PRIORITY DOCUMENT

1997年 5月30日

特 許 庁 長 官

Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3040765

【書類名】 特許願

【整理番号】 H092704

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成 8年10月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明の名称】 自己免疫疾患の診断薬

【請求項の数】 9

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市右京区西院月双町111-116

    【氏名】 尾▲さき▼ 承一

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府枚方市伊加賀西町79-40-506号

    【氏名】 傍島 淳子

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉下在地町211-2 ベルヴェ宝ヶ池105号

    【氏名】 岡崎 貴裕

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎修理式町1 うるしの館小兵衛2-C

    【氏名】 上▲すぎ▼ 裕子

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市中京区三条通柳馬場東入ル中之町9 グランデアサイ13-B

    【氏名】 田中 真生

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市西京区大枝北沓掛町4-1-2

【氏名】 中尾 一和

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県流山市西初石3丁目472の21

【氏名】 吉田 充輝

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市西弁財1-14-2-505

【氏名】 白川 仁

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県姫路市日出町2-19-2 朝日プラザ姫路東3  
05

【氏名】 小坂田 史雄

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 古田 武

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第261895号

【出願日】 平成 7年10月 9日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 8年特許願第187945号

【出願日】 平成 8年 7月17日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001878

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 新規性の喪失の例外証明書提出書 1

【援用の表示】 変更を要しない為省略する

【包括委任状番号】 9407889

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 自己免疫疾患の診断薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患の診断薬。

【請求項2】 前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、またはクローン病である請求項1に記載の診断薬。

【請求項3】 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、またはラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項1に記載の診断薬。

【請求項4】 HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患を診断するためのキット。

【請求項5】 前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、またはクローン病である請求項4に記載のキット。

【請求項6】 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、またはラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項4に記載のキット。

【請求項7】 自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法であって、該方法はHMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する試薬と、自己免疫疾患患者の体液成分とを反応させる工程を含む方法。

【請求項8】 前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、

顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、またはクローン病である請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、ラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は自己免疫疾患患者の抗体が反応するhigh mobility group protein-1 (HMG-1)、high mobility group protein-2 (HMG-2)、あるいはそれらのポリペプチドの断片を用いる自己免疫疾患の診断薬あるいは診断のためのキット、および自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法に関するものである。特に、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、およびクローン病患者の抗体が反応するHMG-1、HMG-2、あるいはそれらのポリペプチドの断片を用いる慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、およびクローン病の診断薬あるいは診断のためのキット、および当該患者の抗体を検出する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

自己免疫性疾患や炎症性の疾患には種々の抗好中球細胞質抗体 (ANCA) が存在することが報告されている。ANCAは間接蛍光抗体法 (IIF) により検出された自己抗体であり、その染色パターンによりサイトプラスミック-ANCA (cANCA) とペリヌクレア-ANCA (pANCA) に区別される。cANCAはWegener肉芽腫症に80%という高頻度で検出され、その抗原は90%以上がプロテイナーゼ-3 (proteinase-3: PR-3) である。他方、pANCAは顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyarteritis)、pauci-immune型壊死性半月体形成性腎炎 (necrotizing crescentic glomerulonephritis, NCGN) に80%の高頻度で検出され、その抗原は80%がミエロパーオキシ

ダーゼ (myeloperoxidase: MPO-ANCA) である。このように疾患特異性の高い抗体の測定により血管炎症候群の早期診断や鑑別診断が可能となっている。

【0003】

最近、潰瘍性大腸炎 (UC) 等の慢性炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD)、慢性関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE)、自己免疫性肝炎 (AIH)、悪性腫瘍、アメーバ膿瘍、スウィート病等の炎症性の諸疾患の患者にpANCAが認められている。pANCAの抗原としてラクトフェリン、カテプシンG、エラスターゼ、リゾチーム等が同定され、病因や病態との関連が研究されているが、これら抗原のpANCAに対する特異性は低く、他の抗原が存在することが示唆されている。

【0004】

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎 (UC) およびクローン病 (CD) においては間接蛍光抗体法でこれらの抗好中球細胞質抗体 (ANCA) が検出される割合 (陽性率) はそれぞれ、40~87%および6~27%とされている。その染色パターンは潰瘍性大腸炎ではpANCAが80~95%を占めるのに対して、クローン病ではpANCAおよびcANCAが均等に検出されている。他方で、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群ではpANCAが多く、それぞれ33% (4%)、43% (2%)、50% (8%) である (括弧内はcANCA陽性率)。

【0005】

潰瘍性大腸炎およびクローン病で検出されるANCAに対応する抗原としてはラクトフェリン (Lactoferrin)、カテプシンG (cathepsinG)、ミエロパーオキシデース (myeloperoxidase) およびミエロパーオキシデース+エラスターゼ、ミエロパーオキシデース+エラスターゼ+カテプシンG等種々の報告がされているが、これらの疾患に特異的に対応する抗原は未だ決定されていないのが現状である。他のpANCA陽性疾患に対応する抗原も同様に同定されていない。

【0006】

潰瘍性大腸炎やクローン病の臨床上の標準的な診断には、内視鏡検査、X線検査がある。これらの検査は患者にとっては、費用が高く、苦痛を伴い、また拘束される時間が長いという欠点がある。他方で、最近になって潰瘍性大腸炎の血清

学的診断として間接蛍光抗体法によるpANCAの検出が報告されている。しかし、この方法は、感度が高くないうえ、バックグラウンドが高くなる傾向にある、さらに、好中球あるいは他の細胞をプレートにエタノールで固定化して用いるため細胞の状態や固定化技術により結果が信頼できないという欠点を有しており、まだ一般には利用されていない。クローン病については自己抗体も見つかっていない。以上のように、患者血清を用いる特異的で簡便な潰瘍性大腸炎やクローン病の診断方法が開発されていないのが現状である。

【0007】

慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデスではリウマチ因子あるいは抗核抗体のような種々の自己抗体が産生されるが、強皮症、多発性筋炎、ベーチェット病、結節性動脈周囲炎などでは検出される自己抗体が少なく、その診断には臨床症状が主体を占めることとなる。これらの疾患では、早期の段階で疾患を診断し、十分な治療を施して成熟疾患に進行させないように努めることが予後に重要であると指摘されるようになっているが、早期診断において血清学的に簡便な診断法は開発されていない。

【0008】

一般的に、自己免疫疾患が疑われるときには、抗核抗体の検査が一次スクリーニングにおける診断法として利用されている。抗核抗体は細胞核の核酸や種々の核蛋白成分を抗原とする自己抗体の総称であり、その種類は多彩である。抗核抗体の検出方法としては間接蛍光抗体法が主に用いられている。抗核抗体としては、核の染まる型により、抗DNA抗体、抗ヒストン抗体、抗ENA抗体、抗セントロメア抗体、抗核小体抗体などが推測される。しかしながら、間接蛍光抗体法による抗核抗体の測定は、精度を一定にするのに多くの問題があることが指摘されている。例えば、核材（細胞）が施設により異なる、検量線が引けない、自己抗体が不均一であるなどが挙げられるが、最も大きな欠点は、この検査法が肉眼的観察によって判定されるものであるため、判定基準および判定技術が非客観的なことである。

【0009】

しかしながら、この間接蛍光抗体法による抗核抗体の測定はこうした欠点を持

ちながらも全身性エリテマトーデスを中心とした各種膠原病の診断や臨床像を把握する上で不可欠のものとなっている。他方で、上記した理由から抗核抗体に変わる自己抗体（自己抗原）を同定し、それを用いる簡便で施設間格差のない客観性のある自己免疫疾患の一次スクリーニング法が望まれていることも事実である。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従って、自己免疫疾患患者の自己抗原を特定し、その自己抗原を用いて自己抗体を検出することは、自己免疫疾患であるとの診断の確定および適切な治療方針の確立に道を開くものである。そこで自己免疫疾患に出現する共通の自己抗原を同定および単離すること、およびこの抗原を用いる簡便な抗体の検出方法の開発が望まれている。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、上記の従来の問題点を克服するため鋭意研究を重ねた結果、自己免疫疾患、特にpANCA陽性の潰瘍性大腸炎患者血清中の抗体を用いて、この抗体が反応する新規な抗原として既知の蛋白質であるhigh mobility group protein-1 (HMG-1)およびhigh mobility group protein-2 (HMG-2)を単離同定することに初めて成功した。このHMG-1およびHMG-2を用いたELISA系を構築することにより、この抗原に対して、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、およびクローン病患者の抗体は陽性率が高いことを示し、さらに、このELISA系が間接蛍光抗体法による抗核抗体の測定法と比較して相対的に感度が高く、簡便で信頼性および客観性のあることを示すことにより、当該抗原に対する抗体の検出が慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病患者などの診断用のマーカーになりうることを見だし、本願発明を完成させるに至った。

## 【0012】

HMG抗原は、今までにANCAの抗原としてではなく自己免疫疾患で抗核抗体の一つとして測定されている。Dennis J.S.らは全身性エリテマトーデス患者で抗HMG-1抗体が10.3%、抗HMG-2抗体が6.9%であり、混合性結合組織病、慢性関節リウマチでは両抗体とも0%と報告している (Science 215, 1245-1247, 1982)。さらに、Briolay J.らは、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、および強皮症でイムノブロット法により抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を検出した結果、両抗体とも診断的価値はないと報告している (Autoimmunity 2, 165-176, 1989)。HMG抗原の純度、ELISA法、イムノブロット法等の手法、測定した患者の状態や検体数などに問題があると思われるが、この時点ではHMG-1およびHMG-2を用いた診断薬の発明は完成していない。しかし、抗HMG-1抗体、抗HMG-2抗体陽性例としては、抗核抗体陽性の若年性リウマチ患者の39%が抗HMG-1抗体および/または抗HMG-2抗体陽性という報告がある (Wittemann Bら、Arthritis and Rheumatism 33, 1378-1383, 1990)。本願発明では高純度なHMG-1およびHMG-2を用いELISA系を構築し、各種疾患で陽性率を測定したところ、上記9疾患で健常人と比較して統計的に有意な差を認めたことにより、本願発明を完成させるに至った。

## 【0013】

本願発明は、HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患の診断薬、これらの疾患を診断するためのキット、および自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法に関する。

## 【0014】

好適な実施態様においては、前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、およびクローン病である。

## 【0015】

好適な実施態様においては、前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン

、マウス、およびラットのHMG-1またはHMG-2から選択される。

【0016】

このことにより、本願発明の目的が達成される。

【0017】

【発明の実施の形態】

HMG (high mobility group protein) はクロマチン構造に含まれる大量の非ヒストン蛋白質として1964年に発見され、すべての高等動植物に普遍的に含まれるタンパク質である。また、核内だけでなく細胞質内にも豊富に存在することがわかっている。生理作用ははっきりとわかっていないが、HMGはDNAと結合するが、DNAとの結合の際には塩基配列に特異的でないが二重らせん構造を緩めることから、転写反応の際、DNAの高次構造を最適構造に変化させて転写活性を高めるとい、きわめて広範囲の転写促進因子およびヌクレオソーム弛緩因子として機能すると考えられている。HMGには、いくつかの種類が存在する。

【0018】

本願発明に用いられるポリペプチドは、HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片から選ばれる。

【0019】

HMG-1 (high mobility group protein-1) ファミリーとは、配列番号1に示されるヒトHMG-1と90%あるいはそれ以上のアミノ酸相同性を有するポリペプチドをいい、例えば、ウシHMG-1 (配列番号3)、ブタ (配列番号4)、ラット (配列番号5) などのHMG-1を含む。好ましくはヒトHMG-1であるが、ホモロジーの高さから、ブタ、ウシ、ラットが使用できる。これらのHMG-1のアミノ酸配列の比較を図13示す。

【0020】

他方、HMG-2 (high mobility group protein-2) ファミリーとは、配列番号2に示されるヒトHMG-2と80%あるいはそれ以上のアミノ酸相同性を有するポリペプチドをいい、ブタHMG-2 (配列番号6)、ウシHMG-2の部分配列 (配列番号7)、チキンHMG-2 (配列番号8)、チキンHMG-2a (配列番号9)、マウスHMG-2 (配列番号10) などのHMG-2を含む。好ましくはヒト、ブタ、ウシのHMG-2であ

る。これらのHMG-2のアミノ酸配列の比較を図14に示す。

#### 【0021】

HMG-1あるいはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドには、アミノ酸が一つまたはそれ以上、欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドあるいは、それらの断片であって、自己免疫疾患患者の抗体と反応し得るポリペプチドも含まれる。

#### 【0022】

これらの断片とは、HMG-1ファミリーまたはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドの断片のうち、自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片をいう。断片は、化学的に合成されたり、あるいは適当な蛋白分解酵素を用いて作製され得る。作製された断片が抗体と反応するか否かは、自己免疫疾患患者から得られた血清と反応させることにより、決定し得る。この方法は当業者には周知であり、下記の抗体の検出方法と同じ手法が用いられ得る。

#### 【0023】

HMG-1およびHMG-2は、あらゆる細胞が持っている普遍的な蛋白質であるためいかなる臓器、組織、細胞からでも抽出することにより調製され得る。例えばヒト胸腺、ブタ胸腺、ウシ胸腺、ヒト胎盤、好中球、HL-60細胞株等である。抽出および精製方法は公知であり、例えば、G. H. Goodwinら (Biochemica et Biophysica Acta, 405, 280-291, 1975) や、M. YoshidaおよびK. Shimura (J. Biochem. Tokyo, 95, 117-124, 1980)、Y. Adachiら (J. Chromatogr, 530, 39-46, 1992) の方法により調製され得る。また、ウシのHMG-1およびHMG-2混合物が和光純薬社より販売されている。

#### 【0024】

上記のHMG-1ファミリーまたはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドは、それを生産する上記組織や培養細胞より、あるいはそのポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞に導入して発現させることにより、生産され得る。アミノ酸が一またはそれ以上、欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドは、例えば、HMG-1またはHMG-2の遺伝子配列をもとに、周知の方法、例えば、部位特異的突然変異、M13ファージを用いる欠失突然変異などの方法で遺伝

子配列を改変して、これを発現させることにより生産され得る。宿主細胞としては、原核生物、真核生物のいずれもが用いられ得る。例えば、大腸菌、バシラスなどの細菌、酵母、カビ、昆虫細胞、哺乳動物細胞などが挙げられる。ポリペプチドの精製には、公知の方法、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーが、単独であるいは組み合わせて、用いられ得る。好適には逆相HPLCやイオン交換クロマトグラフィーが用いられ得る。逆相HPLC用カラムとしては、市販の種々のカラムが用いられ得るが、好適には蛋白質分離用カラム、例えば、YMC-プロテインRPカラム（ワイエムシー社製）が用いられ得る。またイオン交換クロマトグラフィーとしては、例えばpolybuffer-exchanger PBE94カラムクロマトグラフィー、あるいはmonoQカラム（ファルマシア社製）等が用いられ得る。

#### 【0025】

本願発明においては、自己免疫疾患として、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、多発性筋炎／皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、およびクローン病が挙げられる。

#### 【0026】

本願発明でいう潰瘍性大腸炎とは、以下の症状を有するものをいう。まず、潰瘍性大腸炎とは、主として粘膜と粘膜下層を侵す、大腸、特に直腸の特発性、非特異性の炎症性疾患をいう。この疾患は、30歳以下の成人に多いが、小児や50歳以上のものにも見られる。原因は不明で、免疫的機序や遺伝因子、心理学的要因の関与が考えられている。通常血便下痢と種々の全身症状を示す。長期にわたり、かつ大腸全体をおかす場合には悪性化の傾向がある。難治性の潰瘍性大腸炎とは、上記潰瘍性大腸炎が、厳密な内科的治療下でありながら、①慢性持続性、②再燃後の6ヶ月間以上なお活動期にある、③頻回に再燃を繰り返す、のいずれかの条件を満たす症例をいう。

#### 【0027】

クローン病は、小腸や大腸を含む全消化管におこる可能性のある原因不明の炎

症性腸疾患である。非連続性あるいは区域性病変、縦走潰瘍、全層性炎症性病変（腫瘍または狭窄）、非乾酪性肉芽腫などを特徴とし、若年（15～24歳）の発症が多い。自己抗体は発見されておらず簡便な血清学的診断法はない。

【0028】

慢性関節リウマチ（RA）は原因不明の慢性進行性の難病である。RAの本態は、自然治癒傾向を示さない慢性滑膜炎にあり、リンパ球の浸潤、血管新生、滑膜細胞の重層化とともに滑膜細胞の増殖が見られる。手足の小関節および膝、肘、肩、股関節などの大関節が対称性におかされる。そしてこのような関節における滑膜炎の持続と炎症組織の増殖が、やがて軟骨や骨を破壊する結果、関節変形や身体障害がもたらされる。

【0029】

全身性エリテマトーデスは多臓器疾患であり様々な疾患を併発する。蝶型紅斑などの皮膚症状、口腔潰瘍、関節炎、ループス腎炎、中枢神経病変をはじめとして全身ほぼ全ての組織、臓器に非感染性の炎症病変が起こる。また、種々の自己抗体が産生されるが、疾患特異的な自己抗体は特定されていない。診断的には間接蛍光抗体法による抗核抗体の出現率がほぼ100%であるが、特異性は高くない。若年女性に圧倒的に多い疾患である。近年5年生存率は95%を越えるが、経過は長期におよび、寛解増悪を繰り返すことが多い。

【0030】

シェーグレン症候群は、涙腺と唾液腺を主とする外分泌腺、あるいは水分分泌組織の慢性炎症性疾患であり、涙液と唾液分泌量減少による口腔および目の乾燥症候群である。多くが乾燥症候群のみであるが、一部に甲状腺、肺、胃腸、肝、腎などの障害を合併することがあり、また、約30～40%に慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデス、強皮症などを重複し、臨床的に多彩な病状を呈することがある。赤沈亢進、高ガンマグロブリン血症、各種の自己抗体が認められる。免疫学的検査では、自己抗体は多彩であり、リウマチ因子（80%）、抗核抗体が過半数にみられる。

【0031】

強皮症（全身性硬化症）は皮膚の硬化と臓器障害をともなう結合組織病である

が、種々の病型が存在し、必ずしも全身性、進行性とは限らない。全身の広範囲の皮膚の硬化（広汎性強皮症）と食道、腸管、肺、腎臓、甲状腺等の臓器障害を合併し、進行が速い予後不良のものから、皮膚の硬化が顔面や手指に局限し、内臓病変は徐々に出現するCREST症候群と呼ばれる予後良好のものまでさまざまである。抗核抗体の中でトポイソメラーゼⅠに対する自己抗体である抗Sc1-70抗体は、広汎性の本症に特異性が高い（陽性率30%）。抗セントロメア抗体は、本症のうちCREST症候群に、また本症と多発性筋炎の重複症候群には、抗Ku抗体が診断的価値が高い。

#### 【0032】

原発性胆汁性肝硬変は中年以降の女性に好発し、皮膚掻痒感、黄疸を特徴とする慢性の疾患（症候性）であるが、これらの症状をとともわず偶然発見される無症候性もある。小葉間胆管の破壊に始まり、しだいに繊維組織が増生し、肝硬変の組織像へと進展する。これらの胆管を中心とする変化が、持続する黄疸を特徴とする臨床像に反映されている。病因については解明されていない。無症候性、症候性を問わず、約30%に自己免疫疾患（シェーグレン症候群、慢性関節リウマチなど）を合併することが知られている。

#### 【0033】

多発性筋炎（PM）は骨格筋が系統的に非化膿性炎症を起こし、筋痛と筋力低下を示す疾患である。同じPMでも眼瞼の赤紫色紅斑（ヘリオトロープ）や手指関節背面の角化性紅斑（ゴットロン徴候）をとともうものを皮膚筋炎（DM）と呼ぶ。これらは横紋筋でも近位筋を最初におかし、立ち上がれなくなったり、手を挙げられなくなる。重症では首や頭を支えられなくなる。この疾患の一部は癌や悪性腫瘍に併発するので、その場合は癌の治療が必須、先決である

ベーチェット病は、臨床的な主症状として、口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍（発現率99%）、皮膚症状（84%）では結節性紅斑、毛嚢炎、座瘡様皮疹、皮下の血栓性静脈炎、そして皮膚の被刺激性亢進として剃刀負けや針反応、眼症状（90%）では虹彩毛様体炎、網膜脈絡膜炎などを示す、原因不明の難治性疾患である。その他副症状に関節炎や消化器症状がある。

## 【0034】

結節性多発動脈炎は動脈に系統的な炎症をみる代表的な壊死性血管炎である。この疾患は希で診断は難しいが、早期に的確な治療を要する疾患でもある。動脈炎では全身に多彩な病変が起こるが、特に重要なものは皮膚病変、腎病変、消化管病変、中枢神経病変などである。男性に多く、抗核抗体などもみられない。

抗体とは、自己免疫疾患の体液中に存在し、ある特定の抗原性の物質により惹起される、体液に含まれる成分をいう。例えば、潰瘍性大腸炎患者の抗体、あるいは慢性関節リウマチ患者の抗体というときは、それぞれ潰瘍性大腸炎あるいは慢性関節リウマチと診断された患者の血清などの体液に含まれる体液成分をいう。自己免疫疾患の抗体としては、IgM、IgG、IgE、IgD、IgA等が挙げられる。

## 【0035】

本願発明の診断薬は、上記のHMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片を含む。診断薬には、HMG-1ファミリーのポリペプチド、HMG-2ファミリーのポリペプチドあるいはその断片が少なくとも一種類含まれていればよい。好適にはHMG-1およびHMG-2の混合物の使用である。

## 【0036】

本願発明の診断薬は、自己免疫疾患患者の抗体と反応し、抗原抗体複合体を形成する。従って、形成した抗原抗体複合体を検出し得るさらなる成分を含有し得る。これらの成分は、たとえば、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等の方法に適合する成分である。

## 【0037】

HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片は、診断キットにされ得る。診断キットは、例えば、HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片が固定化されたELISA用プレートと、自己免疫疾患患者の抗体と結合した抗原抗体複合体を検出するための試薬とを含み得る。この試薬は、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等の方法に適合する成分を含む。検出するための試薬としては、ELISA法では、例えば2次抗体試薬が挙げられる。2

次抗体試薬は、ヤギあるいはマウスの抗ヒトIgGあるいは抗ヒト (IgA+IgG+IgM) であり、ヒトIgG、IgM、IgAと反応するものである。これら2次抗体は、一般に免疫測定法で用いられる標識剤で標識されていけばよい。そのような標識剤としては、放射性同位体 (例えば $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等)、酵素 (例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミノオキシダーゼなど)、補酵素・補欠分子族 (例えば、FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど)、フルオレセイン誘導体 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチオフルバミルなど)、ローダミン誘導体 (例えば、テトラメチルローダミンBイソチオシアネートなど)、ウムベリフェロンおよび1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸、ルミノール誘導体 (例えば、ルミノール、イソルミノールなど) などが用いられ得る。好適にはアルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼであり、前者の場合基質はパラニトロフェニルリン酸であり、後者の場合はテトラメチルベンジジン (TMBZ) である。抗体と標識剤との結合は、成書 (例えば、「続生化学実験講座5 免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、1986年発行、p102-112) に記載されているような公知の方法から適宜選択して実施し得る。また、標識2次抗体の多くは市販されており利用され得る。例えば、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>ポリクローナル抗体はImmunotect h S.A.社(フランス)から入手し得る。

【0038】

キットの形態としては、抗原が適切な容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に含まれている形態、あるいは、抗原が、容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に固定された形態などが挙げられる。

担体としては、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体 (セファデックスなど)、アガロースゲル (セファロース、バイオゲルなど)、セルロース (ペーパーデスク、濾紙など) などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコーン

などの無機高分子化合物が例示され得る。これらは、アミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、水酸基、スルヒドリル基などの官能基が導入されたものであってもよい。好適な例として、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルが挙げられる。

#### 【0039】

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）、カプセル状、小胞体状などいずれの形態であってもよく、測定法に応じて好適な形状の担体が適宜選択され得る。好適には、ELISA系において一度に多量の検体を処理できる96穴マイクロタイタープレートであり、例えば、EBプレート（ラボシステムズ社製）、Hタイププレート、Cタイププレート（住友ベークライト社製）、マキシソーププレート（Nunc社製）およびE.I.A./R.I.A.プレート（コースター社製）などが例示され得る。

#### 【0040】

担体と抗原の結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法（例えば、「固定化酵素」千畑一郎編、昭和50年3月20日、（株）講談社発行を参照）が採用され得、とりわけ、物理的吸着法は簡便である点で好ましい。抗原と担体とは直接、あるいは抗原と担体との間に他の物質（スパーサー）などを介して結合され得る。固定された抗原は、ゼラチン、BSAなどのブロッキング剤で、非特異的結合を抑制するためにブロッキング処理され得る。

#### 【0041】

本願発明の自己免疫疾患の抗体を検出する方法は、HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片（抗原）と自己免疫疾患の体液成分とを反応させる工程を含む方法である。抗原と抗体とを反応させる条件は、当業者に周知の条件が適用される。抗原抗体反応物の検出も、当業者に公知の方法が適用され得る。検出方法としては、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等が挙げられる。例えば、適当に希釈された患者血清と抗原とを反応させ、洗浄後、2次抗体であるアルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG抗体を加えて反応させ、その後、アルカリフォスファターゼ基質であるp-ニトロフェニルリン酸を加えて発色さ

せ、405nmの吸光度を測定することにより抗HMG-1および抗HMG-2抗体が測定され得る。

#### 【0042】

キットにはHMG抗原の他に、必要により発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、サンプル前処理用試薬等の各試薬から測定法に応じた適当な試薬が適宜選択され得、本願発明のキットに添付され得る。

#### 【0043】

以下、潰瘍性大腸炎患者を例にとり、その抗体と反応する抗原をスクリーニングし、その抗原がHMG-1およびHMG-2であることを特定する方法、並びにHMG-1およびHMG-2抗原を用いたELISA系による抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を測定する方法について説明する。

#### 【0044】

まず、潰瘍性大腸炎患者から血液を採取し、血清成分を得る。次に、その血清成分について抗好中球細胞質抗体（ANCA）の存在を蛍光抗体法で測定する。他方で、健常人の末梢血より比重遠沈法により好中球画分を分離する。次に、この好中球画分を処理して、好中球ライセートを得、ウェスタンブロッティングを行う。例えば、 $10^6$ 個に相当する好中球を2-メルカプトエタノールおよびSDSを含むサンプルバッファーに溶解し、10分間煮沸し、アイスコールドで急冷後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行う。泳動後、常法に従って、ナイロン膜に蛋白質のバンドを転写し、スキムミルク等を用いて非特異的結合をブロックする。

#### 【0045】

他方、ANCA陽性患者の血清をプロテインAカラムに通し、IgG抗体画分を精製する。この精製されたIgG抗体画分と上記ナイロン膜に転写された好中球ライセートを反応させる。ナイロン膜を洗浄後、例えば、ECLキット（アマシャム社製）などの検出剤で化学発光させ、バンドを検出し、抗原の存在が決定される。

#### 【0046】

上記の方法により、抗原性を有するポリペプチド（抗原ペプチド）が確認され得る。このような抗原ポリペプチドは、公知の蛋白質の精製方法を適用して、精

製され得る。

【0047】

あるいは、上記抗体を用いて、抗原ペプチドを生産する細胞株が特定され得る。このような細胞株を用いて抗原ペプチドを生産させ、公知の蛋白質の精製方法を適用して、精製され得る。

【0048】

上記の方法を用いることにより、28kDaの、抗好中球細胞質抗体(ANCA)に対する抗原が特定され得た。後に実施例で示すように、ANCA陽性患者24人中10人に28/39.5/44/47/58kDaの抗原が少なくとも一つ以上が検出され、この内7人が28kDa抗原を持っており、さらに7人中5人が難治性の潰瘍性大腸炎と診断されていた。他方、間接蛍光抗体法でANCA陰性の潰瘍性大腸炎患者血清では陽性バンドは検出されなかった。なお、本願発明における抗原の分子量は、10%SDS-PAGEで決定したものをいう。

【0049】

上記スクリーニング方法で、28kDa抗原を産生する細胞をスクリーニングしたところ前骨髄性白血病由来の好中球系の細胞であるHL-60細胞株(ATCC CCL-240)が28kDa抗原を持つことがわかり、さらに、ウェスタンブロッティングの結果から28kDa抗原に加えて29kDa抗原が存在することが示唆された。このHL-60細胞株から、28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。28kDa抗原および29kDa抗原の精製には、公知の蛋白質の精製方法が適用され得る。例えば、HL-60細胞株を、5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養し、細胞を6M塩酸グアニジンに溶解し、超音波処理を行うことにより蛋白分解酵素を失活させる。完全に蛋白質を溶解させ、透析、例えば限外濾過により、濃縮すると同時に溶液をPBSに置換する。この水溶液から、28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。好適には逆相HPLCが用いられ得る。アセトニトリルの濃度勾配を用いる逆相HPLCで分画することにより90%以上の純度を有する28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。アセトニトリルの濃度勾配を用いる逆相HPLCの条件は当業者には周知の条件で行われ得る。

【0050】

精製された蛋白質のアミノ酸配列の解析の結果、29kDa抗原はhigh-mobility group protein-1 (HMG-1)、および28kDa抗原はhigh-mobility group protein-2 (HMG-2) と同定された。

【0051】

抗体陽性患者の精製IgGをウシのHMG-1およびHMG-2で吸収した後、精製28kDa抗原および29kDa抗原との反応をウェスタンブロッティングでみたところ、反応しなかった。このことから、抗原はHMG-1およびHMG-2であることが確認された。

【0052】

さらに、ヒト胸腺およびブタ胸腺よりHMG-1およびHMG-2画分を調製しウェスタンブロッティングを行ったところ患者抗体と反応することがわかった。

【0053】

ヒトHMG-1のアミノ酸配列は、ブタ、ウシ、およびラットと比較して(図13)それぞれアミノ酸が2個、1個、および2個が異なるだけであるため、ヒトの代わりにこれらの動物のHMG-1をELISAの抗原として用いることが可能である。またHMG-2に関してはヒトとブタはアミノ酸2個が異なるだけであるため(図14)、やはりヒトの代わりに用いることが可能と考えられる。ウシに関しては図14に示した様に、部分配列しか決定されていない上に報告されている配列も不確かと考えられる(ウシの配列は蛋白質データベースPIR B61611より転載)。HMG-1およびHMG-2は種間でかなりよくアミノ酸配列が保存されている蛋白質と考えられ、ヒトとブタの高度な類似性を考慮に入れると、ウシも2個より多く異なるとは考えられない。このことは上記した吸収実験で、患者抗体がウシのHMG-1およびHMG-2で吸収されヒトのHMG-1およびHMG-2と反応しなくなったことから示唆される。

【0054】

HMG-1およびHMG-2はヒト、ブタ、あるいはウシの胸腺組織から、前記の文献の方法に従って簡便に調製され得る。ヒト胸腺組織からの調製法を例に簡単に述べる。子供胸腺組織を細切片にし、0.075M NaCl/0.025M EDTA(pH7.5)に懸濁させベリトロンホモゲナイザーで細胞を破壊する。遠心によりクロマチンを含む沈澱を

回収し、0.35M NaCl(pH7)に懸濁させ、ホモゲナイザー処理によりクロマチンに結合したHMGを遊離させる。遠心により不溶物を除去し、得られた上清を2%トリクロロ酢酸溶液とし4℃で2時間放置し、HMG-1およびHMG-2以外の不溶性蛋白質を沈澱させる。上清を遠心分離して回収し、アンモニア/アセトンによるアルカリアセトン沈澱を行い、沈澱してきたHMG-1およびHMG-2を遠心分離により回収する。沈澱を90%アセトンで洗浄後乾燥させた。この画分を6M塩酸グアニジンに溶解し、透析によるPBSへの置換と濃縮を行い、HMG-1およびHMG-2画分とした。このHMG-1およびHMG-2画分はウェスタンブロッティングにより潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した。

## 【0055】

本願発明で用いたブタHMG-1およびブタHMG-2は本願発明者の一人である吉田らの方法(Y. YoshidaおよびK. Shimura, J. Biochem. Tokyo 95, 117-124, 1980, およびY. Adachiら, J. Chromatogr, 530, 39-46, 1992)により調製および精製した純度95%以上の標品を用いた。これらはヒトのHMG-1およびHMG-2同様患者血清と反応した。

## 【0056】

また、市販のウシのHMG-1およびHMG-2(和光純薬社製)も、潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した。従って、HMG-1およびHMG-2は、潰瘍性大腸炎患者の抗原であると考えられる。

## 【0057】

精製ブタHMG-1およびHMG-2を用いて上記の方法に従ってELISA系を構築した。即ち、96ウェルのELISA用プレート(Nunc社製)の各ウェルに5  $\mu$ g/mlのブタHMG-1あるいはHMG-2を50  $\mu$ lずつ添加し、4℃で24-36時間静置した。過剰の抗原を除去後、5%BSAによるブロッキングを行う。5%BSAで適当に希釈した患者血清を加え2時間室温で静置する。洗浄液で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>を加え、室温で2時間反応させる。洗浄液で5回洗浄後、パラニトロフェニルリン酸(Sigma社製)溶液(10%ジエタノールアミン溶液)を加え、室温で20-25分反応させ、405nmの吸光度を測定する。

【0058】

この系を用いて、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体とも陽性の潰瘍性大腸炎患者血清を用いて標準曲線を検定したところ、両抗原とも濃度依存的な直線が得られ、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定が可能であることがわかり、このELISA系を用いて各疾患での抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を測定できることが示唆された。

【0059】

そこで、種々の自己免疫疾患である、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病患者および健常人について抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を別々に測定した。その結果、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、およびベーチェット病を除く7疾患で、HMG-1の方がHMG-2より抗原性が強く陽性率が高かった。また、HMG-1については多発性筋炎/皮膚筋炎以外の9疾患で健常人と比較して統計的に有意な差を示した。さらに、間接蛍光抗体法による抗核抗体陽性率と比較したところ、10疾患中7疾患で抗HMG抗体陽性率が抗核抗体陽性率と同等かそれ以上の値を示した。これにより、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定は、間接蛍光抗体法による抗核抗体の検出に代わり得る自己免疫疾患診断法となる可能性が示された。また、抗核抗体検査との併用により、より広く確実に自己免疫疾患を診断し得ると考えられる。

【0060】

pANCAの対応する抗原としてHMG-1およびHMG-2が同定されたが、これらはもともと核内蛋白質として同定されており、今まで抗核抗体と呼ばれていた抗体の抗原である可能性がある。従って、pANCA陽性疾患だけでなく抗核抗体陽性疾患についても抗HMG-1およびHMG-2抗体が検出されることが考えられる。さらには間接蛍光抗体法よりもELISA法の方が感度が高いため、今までANCA陰性あるいは陽性率が低いと考えられていた疾患にも抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体が検出される可能性がある。例えば、自己免疫性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ウェゲナー肉芽腫症、白血球破壊性血管炎、Churg-Strauss症候群、原発性硬化性胆管炎

、混合性結合組織病、悪性腫瘍、アメーバ膿瘍、スウィート病、多発性硬化症、アルツハイマー病、橋本病、甲状腺機能亢進症、赤白血病などが挙げられる。

【0061】

好中球は高度の運動能を有し、盛んな食食能を示す。生体内で炎症が起こると最初に炎症局所に遊走してくる細胞の一つであり、炎症組織の破壊、融解を行い終局的に傷害組織の除去、吸収に向かう。自己免疫疾患における組織傷害においても好中球が局所に浸潤している例が多く、炎症の一助を担っていると考えられている。炎症が継続あるいは緩解と増悪を繰り返すことによる度々の好中球による侵出と傷害組織の食食による濃球の形成により、好中球内部の蛋白質がT細胞やB細胞に暴露されやがて抗体が産生されていくものと考えられる。このようにして産生された抗体が抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体（主には抗HMG-1抗体であるが）とすると、これらの抗体は自己免疫疾患の発症初期から産生されている可能性があり、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定により、早期の自己免疫疾患を診断できる可能性がある。

【0062】

また、炎症の活動期には好中球だけでなく炎症局所の活性化された細胞においてもHMG抗原の産生が亢進している可能性があり、細胞の破壊に伴うHMGの遊離により抗HMG抗体の産生が増強されることが考えられる。従って、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定は、疾患活動性の指標となることが考えられる。

【0063】

さらに本願発明は、ELISAにより抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定を行うキットに関するものも含むが、別法として自己免疫疾患あるいは炎症性疾患患者の末梢血リンパ球とHMG-1およびHMG-2との応答性を調べることにより、疾患特異性を検定することができる。すなわち、HMG-1およびHMG-2あるいは免疫反応性のあるそれらの合成ペプチドに応答してTリンパ球が増殖するかどうか、あるいは同じアッセイ系においてマクロファージによる $\gamma$ -インターフェロンの産生があるかどうかを測定することにより疾患を検出し得る。

【0064】

以下、本願発明を実施例を挙げて説明する。

【0065】

【実施例】

(実施例1) 好中球細胞質抗体 (ANCA) の間接蛍光抗体法による検出

潰瘍性大腸炎患者35人 (男16人、女19人) から末梢血を採取し、遠心分離 (4℃、13分間、2000rpm) して血清成分を得た。この血清について抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の陽性率を間接蛍光抗体法で測定した。対照としてクローン病患者10人 (男9人、女1人) から採取した血液を同様に処理して得た血清成分についても測定した。

【0066】

エタノール固定したヒト好中球を用いた間接蛍光抗体法の測定条件を以下に記載する。

【0067】

まず、末梢血をフィコールパックを用いる比重遠沈法にかけて好中球を分離し、サイトスピンにより、1スライドあたり $10^5$ 個貼付する。これをドライヤーの冷風で風乾し、PBS (0.8% NaCl/0.02% KCl/10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /1.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH7.4) で洗浄する。他方で、サンプルの血清をPBSで1:10に希釈し、その20 $\mu$ lを上記プレートにのせ、湿潤室で、室温で1時間反応させる。反応終了後、PBSで洗浄する。FITC標識ウサギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>抗体 (Serotech社製) をPBSで1:20に希釈し、その20 $\mu$ lを上記プレートに乗せ、湿潤室で、室温で30分間反応させる。反応終了後、PBSで洗浄する。洗浄後、PBSで1:9に希釈したグリセロールで包埋し、蛍光顕微鏡で観察する。この方法で検出した結果を表1に示した。潰瘍性大腸炎患者35人中、24人がANCAを有していた (陽性率は69% : 表1参照)。

【0068】

この陽性患者24人の血清成分中の抗好中球細胞質抗体 (ANCA) は、間接蛍光抗体法の染色パターンとしてはほとんどがpANCA (24人中22人がpANCA、2人がヌクレア-ANCA) であった (表1参照)。後記する表3の患者No.24および25の2人がヌクレア-ANCAであった。

【0069】

【表1】

潰瘍性大腸炎患者およびクローン病患者の間接蛍光抗体法によるANCA

患者	患者数	陽性者 陽性率(%)	染色パターン			タイ-
			ペリヌクレ-	サイトプラスミク	ヌクレ-	
潰瘍性大腸炎	35	24(59)	22	0	2	1/10-1/320
クローン病	10	6(50)	2	4	0	1/10-1/40
正常	39	0(0)				

【0070】

(実施例2) ANCAに対する既知抗原の検討

上記、潰瘍性大腸炎患者35人について、ANCAに対する抗原を検討した。

【0071】

ミエロパーオキシデース (MPO) (Elastin Products社製) 5  $\mu$ g/ml、カテプシン G (CaG) (INC Biochemical社製) 5  $\mu$ g/ml、およびラクトフェリン (LF) (Sigma社製) 10  $\mu$ g/mlを調製し、96穴のマイクロタイタープレートにそれぞれ50  $\mu$ l/well、50  $\mu$ l/wellおよび100  $\mu$ l/well注入し、4℃で1夜、コーティングした。コーティング後、溶液を除去し、5%BSA (ウシ胎仔血清) を含むPBS (5%BSA/PBS) を加え、30分間反応させた。ついで、5%BSA/PBSを除去し、患者から得られた血清を5%BSA/PBSを用いて10倍に希釈し、マイクロタイタープレートに加え、室温で24時間反応させた。反応液を除去し、1%BSA/PBS/0.5%Tween20で5回洗浄した。洗浄後アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体 (Immunotech S.A.社製) を5%BSA/PBSで1000倍に希釈して加え、室温で24時間反応させた。反応終了後、1%BSA/0.5%Tween20/PBSで5回洗浄した。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸 (最終濃度5mg/ml) の10%ジエタノールアミン溶液 (ジエタノールアミン50ml+蒸留水450ml) を100  $\mu$ l加え、室温で30分間発色させた。発色後、405nmの吸光度を測定した。

【0072】

この方法で、抗MPO抗体は、全例で検出できず、間接蛍光抗体法陽性患者24人のうち、抗CaG抗体については9人が陽性であり、抗LF抗体については3人が陽性であった。他の12人は対応する抗原を特定することはできなかった。(後述の表

2 および表3 参照)。

【0073】

(実施例3) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) に対する抗原のスクリーニング

ANCA陽性患者24人について、好中球ライセートを用いたウエスタンブロッティングをおこなった。

【0074】

健康人から末梢血を採取し、フィコールバックを用いる遠心分離法で、好中球画分を調製した。1 ウェルあたりPBS 8  $\mu$ lに好中球を $10^6$ 個浮遊させ、サンプルバッファー (0.2M Tris-HCl pH6.8/10% SDS/25% 2-メルカプトエタノール/25%グリセロール/0.01% BPB)を2  $\mu$ l加えて直ちに10分間煮沸して抗原溶液とした。この抗原溶液を、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後、常法に従い、イモビロン膜 (Millipore社製) にトランスファーし、非特異的結合をブロックするために5%スキムミルク溶液を加えて2時間反応させた。他方、患者血清320  $\mu$ lをプロセップA (Bio Processing社製) (10mlベッドボリューム) にかけて、0.1M-グリシン (pH3.0) を用いてIgG画分を溶出し、精製し、IgG 20mg/mlの溶液を得た。上記調製したイモビロン膜と5%スキムミルクで8倍希釈したIgG溶液1mlとを4℃で一晩反応させた。洗浄後、ミエロパーオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, INC社製) 13  $\mu$ g/mlをさらに反応させ、ECLキット (アマシャム社製) で化学発光させ、バンドを検出した。結果を表2および表3に示す。

【0075】

【表2】

患者No.	IIF	MPO	CaG	LF	28KDa抗原等	難治性
1	+	-	-	-	+	+
2	+	-	-	+	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	+	+
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	+	+
7	+	-	-	+	-	-
8	+	-	+	-	+(39.5KDa)	+
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	+(47KDa)	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	+	-	+	-
15	+	-	-	-	+(44KDa)	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	+	-	+	+
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	+	-

表中+は反応性あり、また難治性であることを示す

【0076】

【表3】

患者No.	IIF	MPO	CaG	LF	28KDa抗原等	難治性
21	+	-	+	-	+	+
22	+	-	-	+	-	+
23	-	-	+	-	-	-
24	+	-	+	-	+(50KDa)	-
25	+	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-

表中+は反応性あり、および難治性であることを示す

【0077】

これらの結果、抗好中球細胞質抗体（ANCA）の陽性患者24人中11人の血清中に、28/39.5/44/47/50/58kDaのバンドのいずれかと結合する抗原が存在することが見いだされた。特に、11人中7人の血清中には、28kDaのバンドと結合する物質が存在することが確認された。この28kDaのバンドを有する7人中5人は難治潰瘍性大腸炎と診断されている患者であった（図1参照）。

【0078】

他方、間接蛍光抗体法でANCAが検出されなかった（ANCA陰性の）潰瘍性大腸炎患者血清からは、28kDaと結合する抗体は検出されなかった。また、対照としたクローン病患者血清では28kDaと結合する抗体は検出されなかった。

【0079】

この結果をまとめると、潰瘍性大腸炎患者35人中24人は間接蛍光抗体法でANCA陽性であり、ウェスタンブロッティングでは35人中11人にANCAと結合する抗原が

存在することが確認された（この11人はすべて間接蛍光抗体法でANCA陽性であった）。また35人中の難治性潰瘍性大腸炎患者は7人存在し、この7人中6人にANCAと結合する抗原がウェスタンブロッティングで検出され、6人中5人に28kDaのバンドが認められた。なお対照としたクローン病患者血清では陽性バンドは認められなかった（図1参照）。

#### 【0080】

この時点で、これらの実験結果は、好中球28kDa抗原に対する抗体の出現が潰瘍性大腸炎の重症度（難治度）を予見させるマーカーになりうることを示唆し、その抗原の単離解析と、単離抗原を用いた簡便な抗体の検出系の開発の重要性を示すものである。

#### 【0081】

（実施例4） HL-60細胞に28kDaおよび29kDa抗原が存在することの確認

前骨髄性白血病由来の好中球系の細胞であるHL-60細胞株を、5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養し、実施例3に記載の方法で、好中球ライセートを作製した。このライセートを用いて、実施例3と同様にウェスタンブロッティングを行った。好中球ライセートを用いたポジティブコントロールとともに、結果を図2に示す。これより潰瘍性大腸炎患者から得られた抗体画分と結合する28kDa抗原が存在することが確認された。また、この28kDaのバンドは常に太いバンドとして検出され、28kDa抗原に近接して29kDaの抗原の存在が示唆された。

#### 【0082】

（実施例5） HL-60細胞からの28kDaおよび29kDa抗原の精製

実施例4で抗原の存在が確認されたHL-60細胞株を5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養した。75cm<sup>2</sup>のフラスコあたり1×10<sup>5</sup>個の細胞が2×10<sup>6</sup>個の細胞となったところで、細胞の総数が2×10<sup>8</sup>個となるように遠心分離して細胞を回収した。6M塩酸グアニジン10mlを加えて溶解し、超音波処理（島津社製USP600）を1分間行った。この操作で、細胞は完全に溶解した。この溶液と同量の蒸留水を加えて2倍に希釈した後、80,000×g、30分遠心分離して上清を回収した、この上清を分子量3,000以下を除去する膜YM3（アミコン社製）を装着したアミコン限外濾過器（アミコン社製）に移し、PBSを加えながら濾過を行い、続いて濃縮する

ことにより最終的に4 mlのPBS溶液とした。このPBS溶液を80,000 × g、30分遠心分離して沈澱を除去し、上清を回収した。回収した上清を抗原含有サンプルとし、このサンプルからHPLCを用いて28kDaおよび29kDa画分を分画した。YMC-パックプロテインRPカラム（ワイエムシー社製）を用い、アセトニトリル濃度16%から48%の濃度勾配により蛋白質を溶出した。結果を図3に示す。図3のNo. 9のピークを回収し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥したサンプルをPBSに再溶解し、再びYMC-パックプロテインRPカラムを用いて、アセトニトリル濃度24%から36%の濃度勾配により蛋白質を溶出した。HPLCシステムは島津社製LC-7Aシステムを用いて行った。結果を図4に示す。No. 5およびNo. 6のピークを回収し遠心濃縮乾燥を行った。遠心濃縮乾燥されたサンプルをSDS-PAGEで泳動し、ウェスタンブロットティングによりPVDF膜（アマシャム社製）に転写し、ボンソウスを用いて染色後、28kDaおよび29kDaのバンドを切り抜き、回収した。精製抗原のウェスタンブロットティングの結果を図5に示す。精製した抗原のSDS-PAGEでは、2種の蛋白質は分離し識別可能となった。両蛋白質とも患者血清に反応したことから、細胞ライセートからのSDS-PAGEでは、分子量が近接しているため分離できないこと、あるいは、好中球の29kDa抗原含有量が少ないため、検出できないことが考えられる。

## 【0083】

## （実施例6） 部分アミノ酸配列の決定およびホモロジー解析

実施例5で回収された28kDaおよび29kDaのバンドを含む膜を乾燥後、アミノ酸配列の決定に用いた。アミノ酸配列の決定は、島津社製の全自動蛋白質一次構造分析装置PPSQ-10システムを用いて行った。その結果、28kDaのバンドはN-末端の32個の部分アミノ酸配列が決定された。配列は以下の通りであった。

## 【0084】

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp（配列番号11）

同様にして、29kDaのバンドのアミノ酸配列を解析したところ、N末端より32個のアミノ酸配列が決定された。配列は以下の通りであった。

【0085】

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp (配列番号12)

【0086】

(実施例7) 部分アミノ酸配列のホモロジー解析

実施例6で得られたアミノ酸配列についてホモロジー解析を行った。Altschul, S.F. らのBLASTプログラム (J. Mol. Biol. 205, 403-410, 1982)を用いて、既知データベースPIRに含まれる全てのアミノ酸配列に対するホモロジーサーチを行った結果、29kDaの抗原はノンヒストン核蛋白質HMG-1(Reeck, G. R. Nucleic Acids Res. 17, 1197-1214, 1989)と32アミノ酸中31個が一致した。また、28kDaの抗原はHMG-2(Majumdar, A. ら Nucleic Acids Res. 19, 6643, 1991)と32アミノ酸中31個が一致した。両抗原とも22番目のシステインが同定できなかった。システインはチオール基を修飾しないと検出できないことから、逆に22番目はシステインと考えられ、SDS-PAGEによる分子量をも考慮に入れて28kDaおよび29kDa抗原は、それぞれHMG-2、およびHMG-1と同定された。

【0087】

(実施例8) HMG抗原による患者抗体の吸収試験

実施例5で精製したHMG-1およびHMG-2抗原と好中球ライセートを実施例3と同様にしてSDS-PAGEを行い、続いてイモビロン膜に転写した。一次抗体として、HMG抗原陽性の潰瘍性大腸炎患者より精製したIgG (0.024mg/ml) とウシHMG-1/2混合物 (0.5mg/ml) を1:2で混合し4℃一晩反応させた抗体溶液を用いた。実施例3と同様に洗浄後2次抗体を反応させ、ECLで検出した。その結果、ウシHMG混合溶液で吸収した抗体では、28kDaおよび29kDaのバンドと好中球の28kDaバンドは消失した(図6)。このことから29kDaおよび28kDaの抗原はそれぞれHMG-1およびHMG-2と考えられる。

【0088】

(実施例9) ヒト胸腺組織からのHMG-1およびHMG-2画分の調製

HMG-1およびHMG-2はヒトやブタ、ウシの胸腺組織から、前記の文献の方法に従って簡便に調製し得る。子供胸腺組織(13g)を細切片にし、30mlの0.075M NaCl

/0.025M EDTA (pH7.5) に懸濁させポリトロンホモゲナイザー (Polytron社製) で氷水中2分間細胞を破壊した (speed 10)。4℃、2,000 × g、30分間の遠心分離によりクロマチンを含む沈澱を回収した。この操作をさらに4回繰り返し (但しホモゲナイズの時間は1分)、沈澱を30mlの0.35M NaCl (pH7) に懸濁させ、ホモゲナイザー処理 (speed 5、1分) によりクロマチンに結合したHMGを遊離させた。この操作をさらに2回繰り返し90mlの溶液とした。4℃、2,000 × g、30分間の遠心分離により不溶物を除去し、得られた上清を2%トリクロロ酢酸溶液とし4℃で1時間放置後HMG-1およびHMG-2以外の不溶性蛋白質を沈澱させた。上清を遠心 (4℃、2000 × g、30分間) により回収し、2-メルカプトエタノールを終濃度0.01Mになるように加えた。30%アンモニアを1.5 ml加え直ちにアセトン300mlを加え攪拌し、4℃で一夜放置した。沈澱してきたHMG-1およびHMG-2を遠心分離により回収し、90%アセトンで洗浄後乾燥させた。この画分を6M塩酸グアニジンに溶解し、透析によるPBSへの置換と濃縮を行いHMG-1およびHMG-2画分とした。このHMG-1およびHMG-2画分はウェスタンブロッティングにより潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した (図7)。また、市販のウシのHMG-1およびHMG-2 (和光純薬社製) も、潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した (図7)。従って、HMG-1およびHMG-2は、潰瘍性大腸炎患者の抗原であると考えられる。

#### 【0089】

(実施例10) ブタ胸腺由来HMG-1およびHMG-2の精製

ブタ胸腺由来HMG-1およびHMG-2をM. YoshidaおよびK. Shimura (J. Biochem. Tokyo, 95, 117-124, 1980)、およびY. Adachiら (J. Chromatogr, 530, 39-46, 1992) の方法に従って精製した。精製法を簡単に述べる。実施例9と同様にし得られたクロマチン画分を0.35M NaCl (pH7)/1mM PMSFに懸濁し、Potter-Elvehjem PTFEホモゲナイザーでホモゲナイズし、5,000×g、20分間遠心分離、上清を回収した。この操作を2回繰り返して、得られた上清を混合した。この画分を2%トリクロロ酢酸溶液とし、遠心分離して沈澱を除去後、上清をさらに10%トリクロロ酢酸溶液とし、析出してきたHMG-1およびHMG-2を含む沈澱を遠心分離して回収した。沈澱を3mlの10mM Tris-HCl (pH7.8) に溶解し、あらかじめ同じ緩衝液で洗浄および平衡化したMono Qカラム (5×50mm、ファルマシア社製) につけ、

分離を行った（ファルマシア社製FPLCシステムを用いた）。溶出は、NaClの0から1 Mへの直線濃度勾配により行った。図8に溶出のパターンを示した。この分画法によりほぼ95%以上の純度でHMG-1およびHMG-2が得られた。

#### 【0090】

ここで得られたHMGは、ウェスタンブロッティングにより患者抗体と反応することが確かめられ、さらにHMG-1画分にはHMG-2、そしてHMG-2画分にはHMG-1が混入していないことが確かめられた（図7）。

#### 【0091】

（実施例11）ウェスタンブロッティングによる、難治性潰瘍性大腸炎患者血清中の抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の検出

ブタHMG-1およびブタHMG-2混合物を抗原としてウェスタンブロッティングを行った。ブタのHMG-1 ( $0.5 \mu\text{g}$ )およびブタのHMG-2 ( $0.5 \mu\text{g}$ )混合物をサンプルバッファー（実施例3）に溶解し、常法に従って熱処理後SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE終了後、PVDF膜に転写し、28kDa陽性の5人の難治性潰瘍性大腸炎患者血清、HRP標識抗ヒトIgG抗体の順で反応させ、ECLにより検出を行った。その結果、5人の難治性潰瘍性大腸炎患者の内4人が陽性であり、1人が28kDa陽性であるが抗原はHMG-1およびHMG-2ではなかった（図9）。これらの結果より、難治性潰瘍性大腸炎患者血清中には抗HMG-1抗体および／又は抗HMG-2抗体が存在することが示された。

#### 【0092】

（実施例12）ELISA法による抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定

ブタHMG-1、ブタHMG-2、ヒトHMG-1およびヒトHMG-2混合物を抗原に用いてELISAを行った。96ウェルのマキシソーププレート（Nunc社製）の各ウェルに $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ から段階希釈したブタHMG-1あるいはブタHMG-2を $50 \mu\text{l}$ 、またヒトの場合 $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ から段階希釈したHMG-1およびHMG-2（等量混合物）を $50 \mu\text{l}$ 添加し、 $4^\circ\text{C}$ で24-36時間静置した。過剰の抗原を除去後、5%BSA $200 \mu\text{l}$ を加え30分以上静置しブロッキングを行った。抗HMG-1抗体および／又は抗HMG-2抗体陽性難治性潰瘍性大腸炎患者血清を標準血清として、これを5%BSAで40倍希釈したものを $50 \mu\text{l}$ 加え2時間室温で静置した。0.05%Tween/0.02%azide/PBS（洗浄液）で5回

洗浄後、1000倍希釈のアルカリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub> (Immunotech S.A.社製) を100  $\mu$ l加え、室温で2時間反応させた。洗浄液で5回洗浄後、0.1%パラニトロフェニルリン酸 (Sigma社製) 溶液 (10%ジエタノールアミン溶液) を100  $\mu$ l加え、室温で20-25分反応させ、405nmの吸光度を測定した。図10に陽性コントロールの検量線を示した。3種のELISAとも用量依存的な直線が得られ、この検量線から、ブタHMG-1 (図10-1)、HMG-2 (図10-2) あるいはヒトHMG-1およびヒトHMG-2混合物 (図10-3) を用いたELISA法により抗HMG-1抗体および/または抗HMG-2抗体が測定できることがわかった。また、測定には吸光度がほぼ1.0になる5  $\mu$ g/mlの濃度のものを用いればよいことが、この検量線から示唆された。

#### 【0093】

(実施例13) 各疾患における抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定

このELISA系を用いて自己免疫疾患および炎症性疾患患者の抗体を測定した。用いた疾患は以下の通りである。慢性関節リウマチ50人、全身性エリテマトーデス47人、シェーグレン症候群12人、ベーチェット病32人、多発性筋炎/皮膚筋炎15人、強皮症20人、原発性胆汁性肝硬変41人、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発性動脈炎19人、潰瘍性大腸炎62人、およびクローン病15人である。一方、コントロールとして健常人33人の血清を用いた。抗原としてブタのHMG-1およびHMG-2をそれぞれ、5  $\mu$ g/mlの濃度で用いた。また血清として、標準血清を40倍希釈したものを測定に供した。各プレートには被検血清用とは別に、実施例12と同様の検量線用の抗原を置き、標準血清 (40倍希釈) を用いて、被検血清と同時に、実施例12に従って測定を行った。各プレートから図10の様な直線性の検量線が得られた場合のみ、同プレート中の検体の測定値を有効とした。標準血清の吸光度から抗原を加えないブランクのウェルの吸光度を引いた値を100%とし、同様にブランク値を引いた被検血清の吸光度値からその割合を算出し被検血清の値とした。血清の40倍希釈で値が高すぎた場合には80倍以上の希釈で測定を行い値を算出した。結果は健常人のmean+2 s.d.を超える値を陽性とした。

#### 【0094】

抗HMG抗体陽性率と抗核抗体陽性率とを比較するため、間接蛍光抗体法による

抗核抗体を同一検体につき測定した。測定はMB L社製フルオロHEPANAテストを用いて行い、40倍希釈以上を陽性とした。

【0095】

表4に抗原別および疾患別の陽性率、図11にHMG-1を抗原に用いた疾患別の散布図、図12にHMG-2を抗原に用いた疾患別の散布図を示した。

【0096】

【表4】

疾患名	n	HMG-1		HMG-2		HMG-1+HMG-2*		抗核抗体	
		陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)
慢性関節リウマチ (RA)	50	31	62.0	17	34.0	34	66.0	29	58.0
全身性エリテマトーデス (SLE)	47	29	61.7	15	31.9	31	66.0	39	83.0
シェーグレン症候群 (SjS)	12	9	75.0	1	8.3	n.c.#	75.0	9	58.3
多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM)	15	3	20.0	2	13.3	n.c.	20.0	10	15.6
強皮症 (PSS)	20	11	55.0	2	10.0	n.c.	55.0	19	85.0
ベーチェット病 (Behcet)	32	10	31.3	6	18.8	12	37.5	9	53.3
原発性胆汁性肝硬変 (PBC)	41	28	68.3	24	47.8	32	78.0	11	26.8
顕微鏡的多発性動脈炎/ 多発性動脈炎 (MPN/PN)	19	8	42.1	3	15.0	n.c.	42.1	3	15.8
潰瘍性大腸炎 (UC)	62	24	38.7	21	33.9	25	40.3	12	19.4
クローン病 (CD)	15	6	40.0	4	26.7	7	46.7	1	6.7
健常人 (Normal)	33	1	3.0	1	3.0	2	6.1	1	3.0

\*: HMG-1陽性数にHMG-2のみ陽性数を加えた値

#: 変化なし

## 【0097】

原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、およびベーチェット病では、抗HMG-1抗体陽性率と抗HMG-2抗体陽性率がほぼ同等の値を示した。しかし、他の7疾患では、抗HMG-1抗体陽性率の方が高く（表4）、HMG-1の方が抗原性が強いことがわかった。特にシェーグレン症候群ではHMG-1が66.7%に対してHMG-2が16.7%と、圧倒的にHMG-1有意であり、このことはシェーグレン症候群の絞り込みに利用できる可能性を示すものである。HMG-1では、多発性筋炎／皮膚筋炎を除く9疾患はいずれも健常人と比較すると統計的に有意な差を示した。一方、HMG-2では、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、ベーチェット病、原発性胆汁性肝硬変および潰瘍性大腸炎が健常人と比較すると統計的に有意な差を示した。抗HMG-2抗体陽性患者は殆どが抗HMG-1抗体陽性であったが、抗HMG-2抗体陽性で抗HMG-1抗体陰性の患者も少数であるが存在していた。従って、より感度の高い診断を行うためには、両抗体を測定する方がよいと考えられる。

## 【0098】

抗HMG-1抗体と抗HMG-2抗体陽性を加えた結果では、原発性胆汁性肝硬変、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、および全身性エリテマトーデスで非常に高い陽性率を示した。原発性胆汁性肝硬変では、抗ミトコンドリア抗体と同等かそれ以上の陽性率と考えられ、残りの3疾患ではこのように高い陽性率を示す抗原は今まで発見されていない。また、強皮症、潰瘍性大腸炎、クローン病、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、ベーチェット病でも陽性率は高く、前3疾患についてはこのような高い陽性率を示す抗原はHMG抗原が初めてである。顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎については、ミエロパーオキシダーゼが高い陽性率を示す抗原であるが、HMGはこれに次ぐ抗原である。本願発明において抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体が、多発性筋炎／皮膚筋炎を除く9疾患で同時に検出できる抗体であることが明らかになった。

## 【0099】

そこで、今回、各疾患について間接蛍光抗体法で抗核抗体を同時に測定し、HMG抗原陽性率と比較した（表4）。10疾患の内7疾患が抗核抗体陽性率と同等かそれ以上の値を示した。これより、HMG-1およびHMG-2の測定は、間接蛍光抗体法

による抗核抗体の検出に代わり得る自己免疫疾患診断法となる可能性が示された。  
また、抗核抗体検査との併用により、より広く確実に自己免疫疾患を診断でき  
ると考えられる。

【0100】

【発明の効果】

慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェ  
ット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎  
、潰瘍性大腸炎、およびクローン病の共通の対応抗原HMG-1 およびHMG-2 を特定  
できたことにより、当該抗原を用いた簡便な抗体の検出が可能となった。さらに  
、HMG-1 およびHMG-2 を用いた両抗原に対する抗体を測定する方法および測定キ  
ットはこれら疾患の診断薬となる可能性が示された。

【0101】

【配列表】

配列番号 1

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-1

起源：ヒト

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5

10

15

Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

20

25

30

35

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys

40

45

50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg

55

60

65

70

Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp

75	80	85	90
Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr			
95	100	105	
Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys			
110	115	120	125
Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu			
130	135	140	
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg			
145	150	155	160
Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser			
165	170	175	180
Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu			
185	190	195	
Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu			
200	205	210	

【0102】

配列番号：2

配列の長さ：208

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2

起源：ヒト

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe			
5	10	15	
Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn			
20	25	30	35
Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys			
40	45	50	

Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg  
 55 60 65 70  
 Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp  
 75 80 85 90  
 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His  
 95 100 105  
 Arg Pro Lys Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys  
 110 115 120 125  
 Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu  
 130 135 140  
 Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser  
 165 170 175 180  
 Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu  
 185 190 195  
 Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu  
 200 205

【0103】

配列番号 3

配列の長さ : 214

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

起源 : ウシ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15  
 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

20	25	30	35
Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys			
40	45	50	
Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg			
55	60	65	70
Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp			
75	80	85	90
Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr			
95	100	105	
Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys			
110	115	120	125
Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu			
130	135	140	
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg			
145	150	155	160
Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser			
165	170	175	180
Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu			
185	190	195	
Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu			
200	205	210	

【 0 1 0 4 】

配列番号 : 4

配列の長さ : 214

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

起源 : ブタ

配列

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe
					5				10					15			
Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Ser	Val	Asn
	20				25				30					35			
Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg	Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys
		40					45						50				
Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala	Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Arg
55					60				65					70			
Glu	Met	Lys	Thr	Tyr	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp
	75					80						85				90	
Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	Tyr
				95					100					105			
Arg	Pro	Lys	Ile	Lys	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Lys
	110				115					120				125			
Lys	Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Lys	His	Pro	Tyr	Glu
		130					135					140					
Lys	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Tyr	Arg
145				150					155					160			
Ala	Lys	Gly	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Val	Val	Lys	Ala	Glu	Lys	Ser
		165				170					175				180		
Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu
			185					190						195			
Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu		
	200					205					210						

【0105】

配列番号：5

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-1

起源：ラット

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
5 10 15  
Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn  
20 25 30 35  
Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
40 45 50  
Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg  
55 60 65 70  
Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp  
75 80 85 90  
Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr  
95 100 105  
Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys  
110 115 120 125  
Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys His Pro Tyr Glu  
130 135 140  
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
145 150 155 160  
Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser  
165 170 175 180  
Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
185 190 195  
Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
200 205 210

【0106】

配列番号 6

配列の長さ：209

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2

起源：ブタ

配列

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Asn	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe	5	10	15	
Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Asn	20	25	30	35
Phe	Ala	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg	Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys	40	45	50	
Glu	Lys	Ser	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala	Lys	Ser	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Asp	Arg	55	60	65	70
Glu	Met	Lys	Asn	Tyr	Val	Pro	Pro	Lys	Gly	Asp	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys	Asp	75	80	85	90
Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	His	95	100	105	
Arg	Pro	Lys	Ile	Lys	Ser	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Thr	Ala	Lys	110	115	120	125
Lys	Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Ser	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr	Glu	130	135	140	
Gln	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Tyr	Arg	145	150	155	160
Ala	Lys	Gly	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Lys	Lys	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr	Gly	Ser	165	170	175	180
Lys	Lys	Lys	Asn	Glu	Pro	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	185	190	195	
Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu											

200

205

【0107】

配列番号：7

配列の長さ：186

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2の部分配列

起源：ウシ

配列

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Asn	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe	5	10	15	
Val	Gln	Thr	Ser	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Ser	Val	Asn	20	25	30	35
Phe	Ser	Glu/Arg	Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys	Glu	Lys	Ser	Lys	Phe	Glu	Asp	40	45	50		
Met	Ala	Lys	Ser	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Asp	Arg	Glu	Met	Lys	Asn	Tyr	Val	Pro	55	60	65	70
Pro	Lys	Gly	Asp	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	Arg	Pro	75	80	85	90
Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Ser	Ala	Glu	His	Arg	Pro	Lys	Ile	Lys	Ala	Glu	95	100	105	
His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Thr	Ala	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Ser	110	115	120	125
Gln	Gln	Ser	Ala	Lys	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr	Glu	Gln	Lys	Ala	Ser	Lys	Leu	Lys	130	135	140	
Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Xaa	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ala	Lys	Gly	Lys	Ser	Glu	Ala	Gly	145	150	155	160
Lys	Lys	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr	Gly	Ser	Lys	Lys	Lys	Asn	Glu	Pro	Glu	Asp	165	170	175	180

Glu Glu Glu Glu Glu Glu

185

【0108】

配列番号：8

配列の長さ：206

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2

起源：チキン

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Tyr Phe

5

10

15

Val Gln Thr Cys Pro Arg Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn

20

25

30

35

Phe Ala Glu Phe Ser Arg Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys

40

45

50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Glu Met Ala Lys Gly Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg

55

60

65

70

Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp

75

80

85

90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His

95

100

105

Arg Pro Lys Ile Lys Asn Asp His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys

110

115

120

125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu

130

135

140

Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg

145

150

155

160

Ala Lys Ser Lys Ser Asp Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Ala Gly Ser

165 170 175 180  
 Lys Lys Lys Ala Glu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
 185 190 195  
 Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 200 205

【0109】

配列番号9

配列の長さ：201

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2a

起源：チキン

Ala Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Lys Gly Lys Met Ser Ala Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15  
 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro Glu Val Pro Val Asn  
 20 25 30 35  
 Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys  
 40 45 50  
 Glu Lys Ala Lys Phe Asp Glu Met Ala Lys Ala Asp Lys Val Arg Tyr Asp Arg  
 55 60 65 70  
 Glu Met Lys Asp Tyr Gly Pro Ala Lys Gly Gly Lys Lys Lys Lys Asp Pro Asn  
 75 80 85 90  
 Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Gly Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro  
 95 100 105  
 Lys Ile Lys Ser Thr Asn Pro Gly Ile Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu  
 110 115 120 125  
 Gly Glu Met Trp Asn Asn Leu Ser Asp Gly Glu Lys Gln Pro Tyr Asn Asn Lys  
 130 135 140  
 Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Val Ala Asp Tyr Lys Ser Lys

145                      150                      155                      160  
 Gly Lys Phe Asp Gly Ala Lys Gly Ala Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Lys Val  
                     165                      170                      175                      180  
 Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Asp  
                                     185                      190                      195  
 Asp Asp Glu  
 200

【0110】

配列番号 10

配列の長さ : 208

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

起源 : マウス

配列の特徴 : HMG-2

Gly Lys Gly Asp Pro Ile Lys Pro Leu Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
                                     5                      10                      15  
 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asn Ser Ser Val Asn  
                     20                      25                      30                      35  
 Phe Ala Glu Ile Ser Lys Lys Cys Ser Lys Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
                                     40                      45                      50  
 Glu Asn Ser Lys Phe Glu Asp Leu Ala Lys Ser Asp Lys Ala Cys Tyr Tyr Arg  
   55                      60                      65                      70  
 Glu Met Lys Asn Tyr Val Ser Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp  
                     75                      80                      85                      90  
 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Cys Leu Phe Cys Ser Glu Asn  
                                     95                      100                      105  
 Arg Pro Lys Ile Lys Ile Glu Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys  
                     110                      115                      120                      125  
 Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Glu Lys Gln Pro Tyr Glu

130 135 140  
 Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Phe Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 Val Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Ala Gly Ser  
 165 170 175 180  
 Lys Lys Lys Asn Asp Ser Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 185 190 195  
 Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 200 205

【0 1 1 1】

配列番号 1 1

配列の長さ : 32

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 28KDaN末端フラグメント

起源

細胞の種類 : 前骨髄性白血病由来の好中球系細胞

セルライン : 好中球系の細胞株(ATCC CCL-240)

配列の特徴

配列を決定した方法 : E

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15  
 Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp  
 20 25 30

【0 1 1 2】

配列番号 1 2

配列の長さ : 32

配列の型 : アミノ酸

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：29KDa N末端フラグメント

起源

細胞の種類：前骨髄性白血病由来の好中球系細胞

セルライン：好中球系の細胞株(ATCC CCL-240)

配列の特徴

配列を決定した方法：E

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5

10

15

Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp

20

25

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 健常人末梢血から分離した好中球細胞質ライセート（抗原）をSD S-PAGEで泳動後、潰瘍性大腸炎患者5人の患者血清と健常人3人の血清から得られた精製IgG（抗体）を用いてウエスタンブロッティングしたときの結果を示す図である。

【図2】 好中球とHL-60の細胞ライセートを抗原とし、28kDa抗原陽性患者の血清をプローブとしたウエスタンブロッティングを行った結果を示す図である。

【図3】 HL-60細胞からの抗原を単離する工程における、HPLCのパターンを示す図である。No. 9のピークに28kDa抗原および29kDa抗原が含まれる。

【図4】 HL-60細胞からの抗原を単離する工程における、HPLCのパターンを示す図である。No. 5のピークに28kDa抗原がNo. 6のピークに29kDa抗原が含まれる。

【図5】 精製28kDa抗原（レーン2）、および精製29kDa抗原（レーン3）のウエスタンブロッティングのパターンを示す図である。

【図6】 HMG-1およびHMG-2による患者抗体の吸収試験を示す図である。ポジティブコントロールはバンドが検出される（1、3）が、抗体が吸収されるとバンド（2、4）が消失した。

【図 7】 ヒト胸腺組織より調製したHMG-1およびHMG-2の混合物、ブタ胸腺組織から調製したHMG-1およびHMG-2、そして市販のウシHMG-1およびHMG-2の混合物のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。ヒト、ブタ、ウシのHMG抗原全てが難治性潰瘍性大腸炎患者血清と反応した。この実施例のみSDS-PAGEのポリアクリルアミドは15%を用いた。

【図 8】 ブタ胸腺からの、HMG-1およびHMG-2の精製を示す図である。

【図 9】 難治性潰瘍性大腸炎患者 5 人と健常人 3 人の、ブタHMG-1 およびブタHMG-2 混合物を抗原としてウェスタンブロッティングを行った結果を示す図である。

【図 10】 ELISA法による抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体の測定結果を示す図である。ブタHMG-1（図10-1）、HMG-2（図10-2）およびヒトHMG-1およびヒトHMG-2混合物（図10-3）において、用量依存的な直線が得られる。

【図 11】 HMG-1を抗原に用いたときの各疾患別の散布を示す図である。

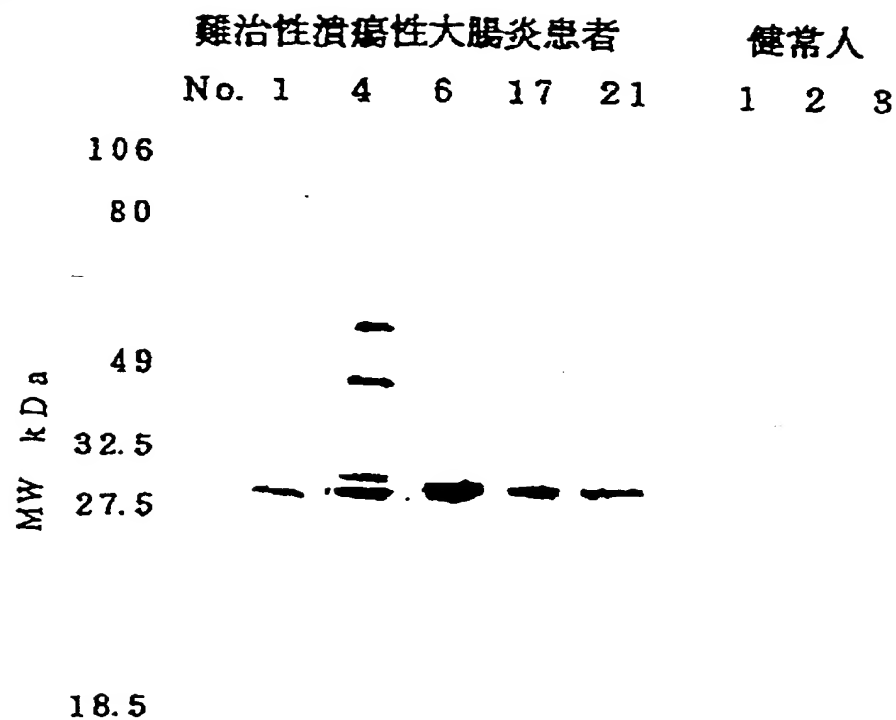
【図 12】 HMG-2を抗原に用いたときの各疾患別の散布を示す図である。

【図 13】 ヒト、ブタ、ウシおよびラットHMG-1 のアミノ酸配列を比較した図である。

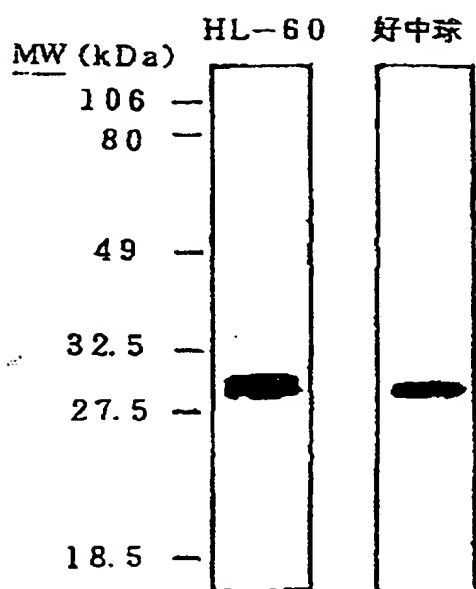
【図 14】 ヒト、ブタ、ウシおよびマウスHMG-2 のアミノ酸配列を比較した図である。

【書類名】図面

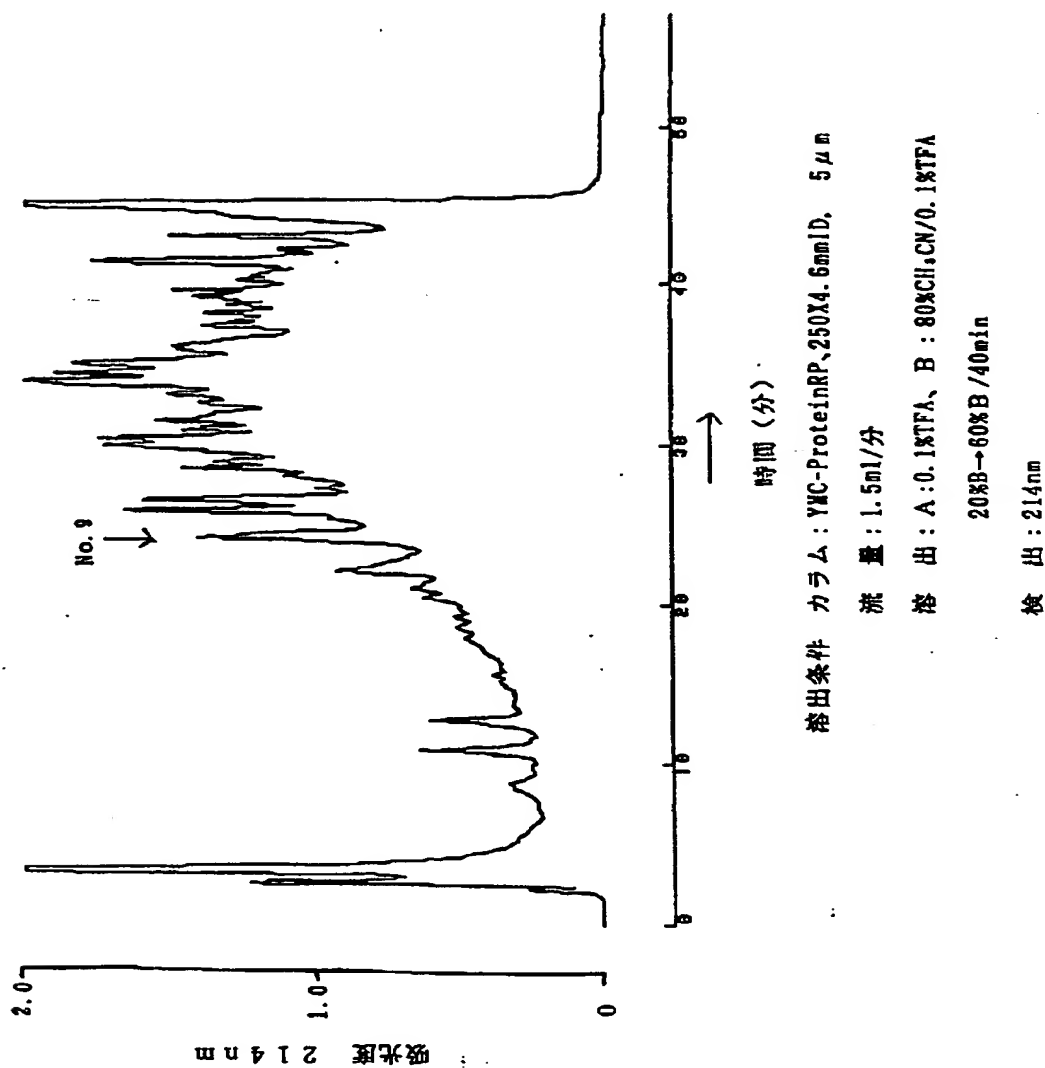
【図1】



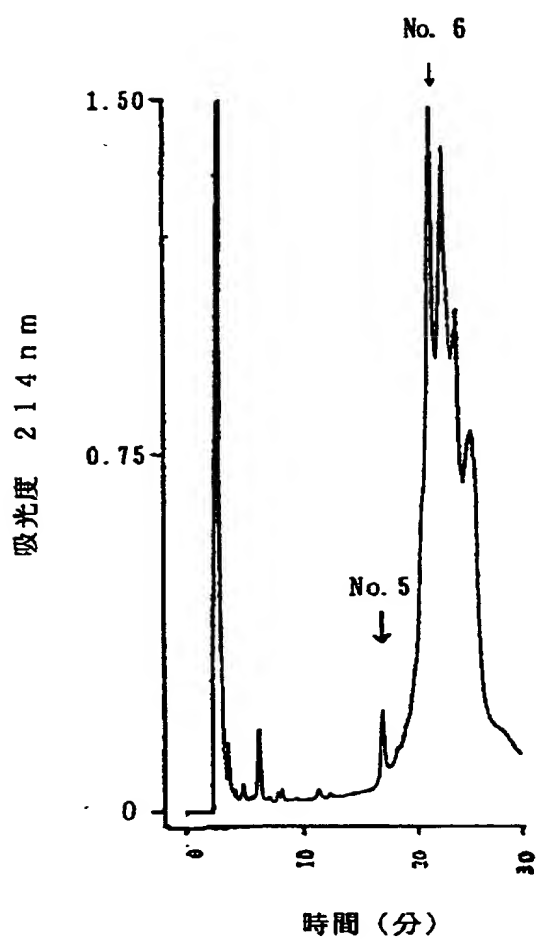
【図2】



【図3】

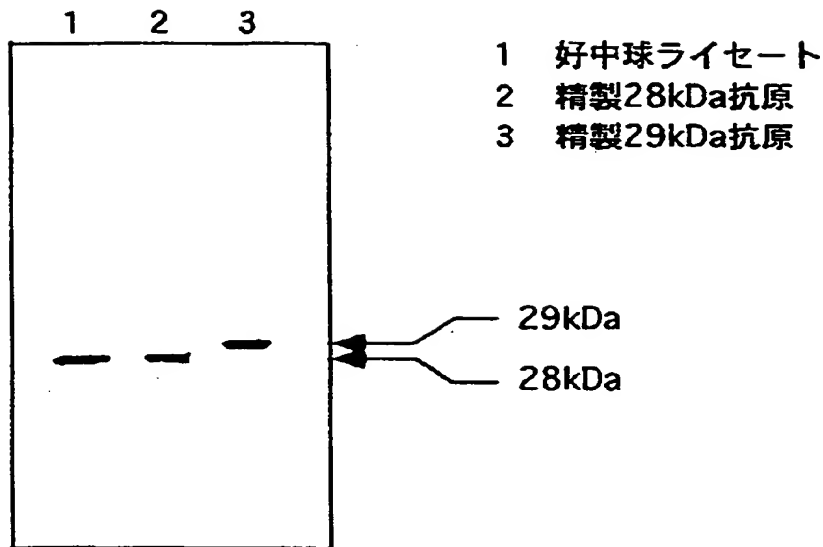


【図4】

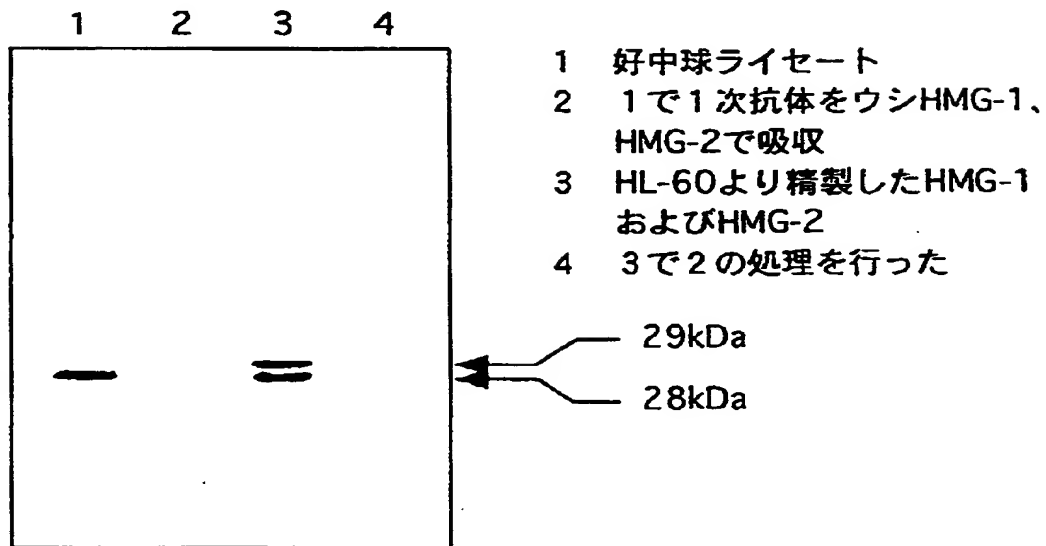


溶出条件 カラム：YMC-ProteinRP、250X4.6mmID, 5 $\mu$ m  
 流量：1.5ml/分  
 溶出：A：0.1%TFA、B：80%CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA  
 30%B→45%B/30min  
 検出：214nm

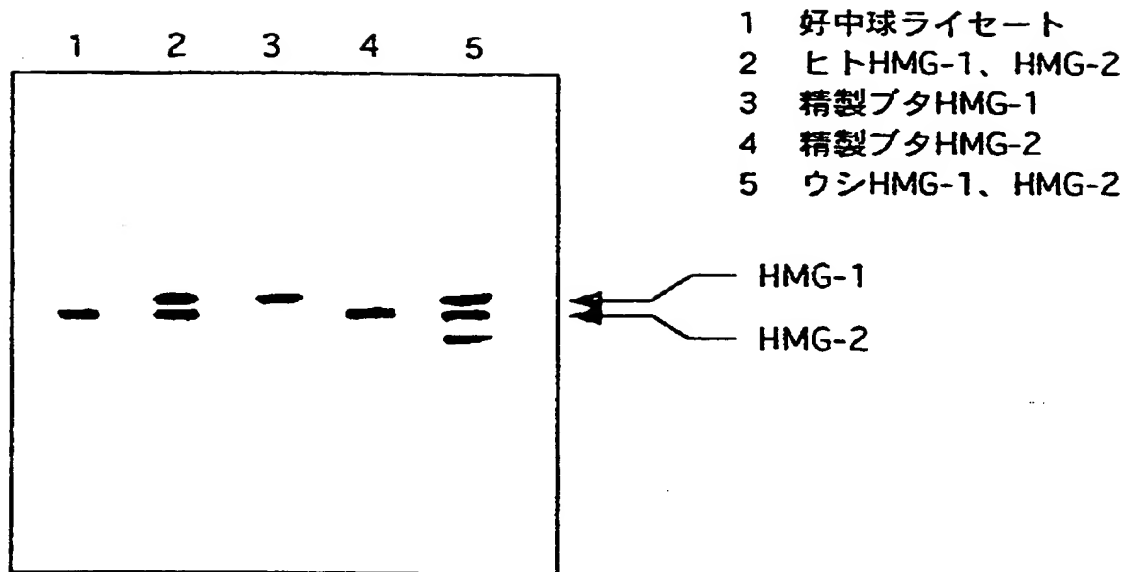
【図5】



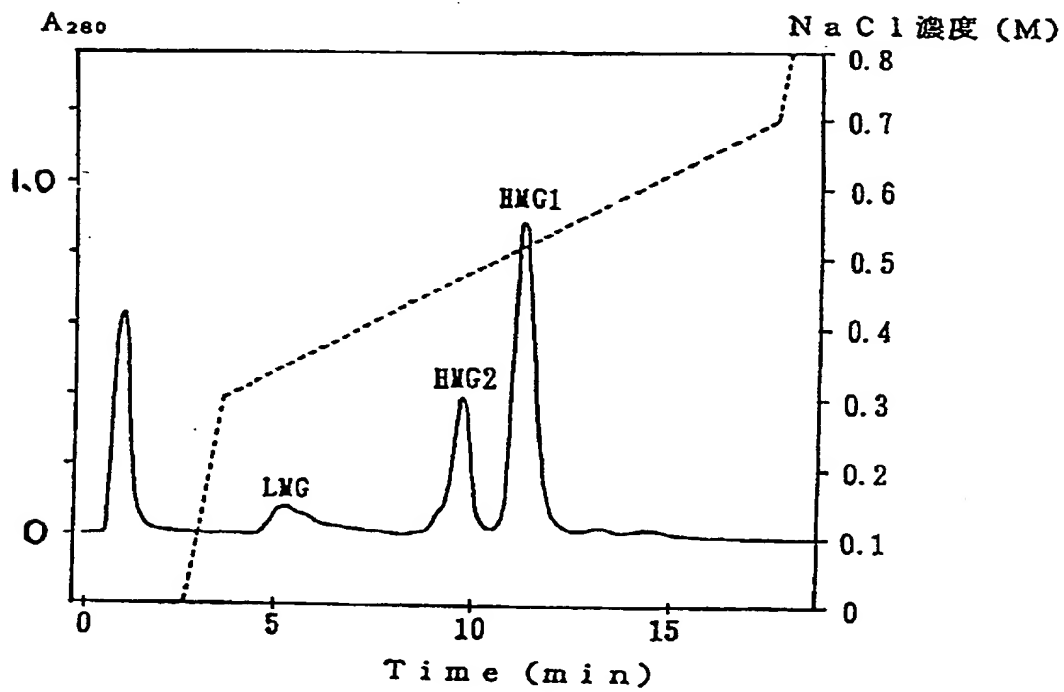
【図6】



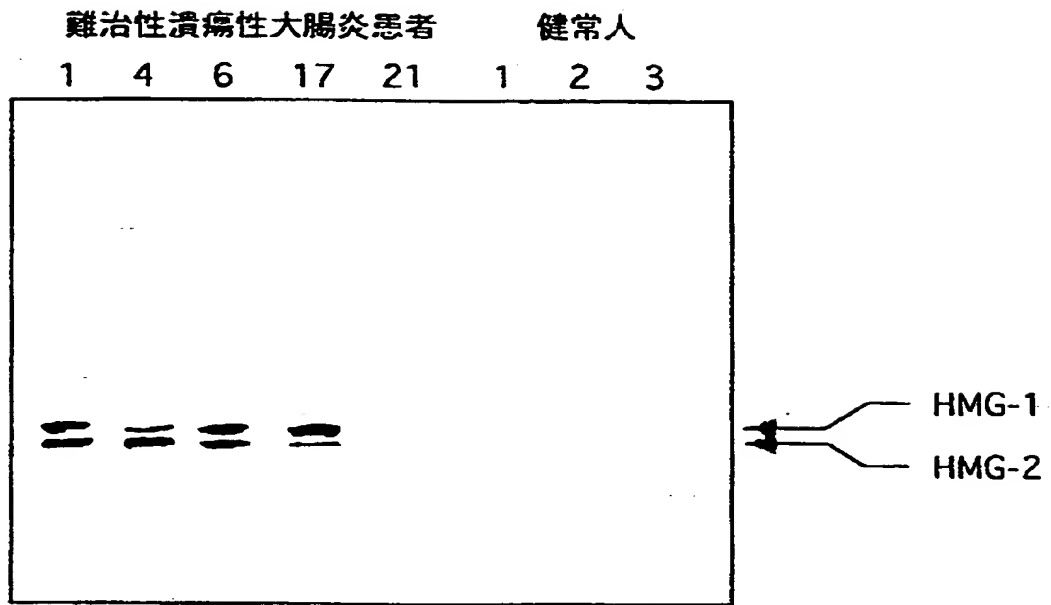
【図 7】



【図 8】



【図9】



【図10】

図10-3

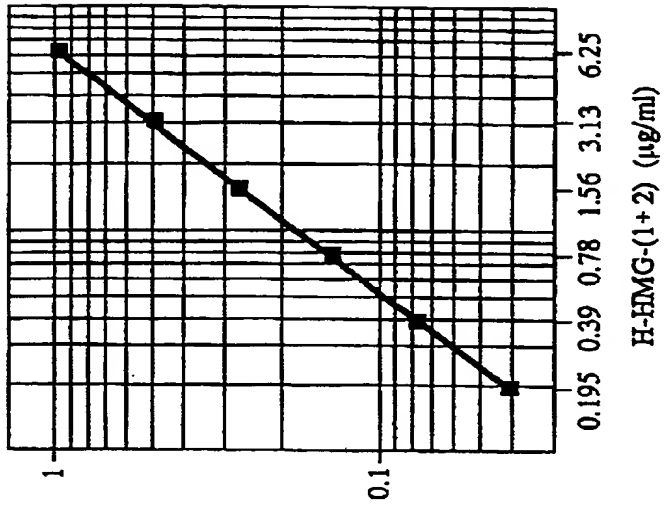


図10-2

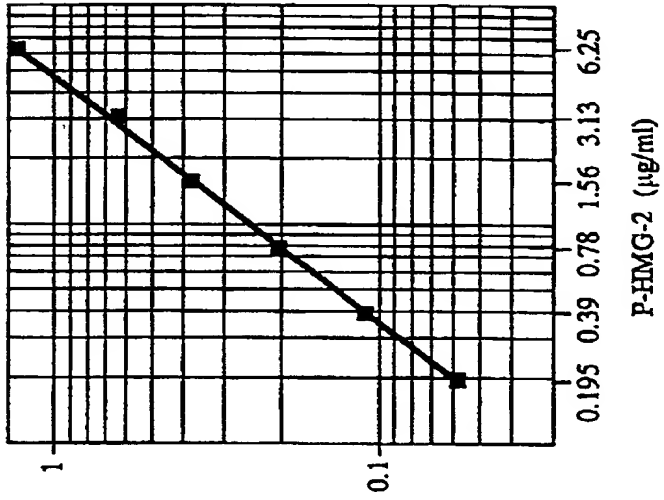
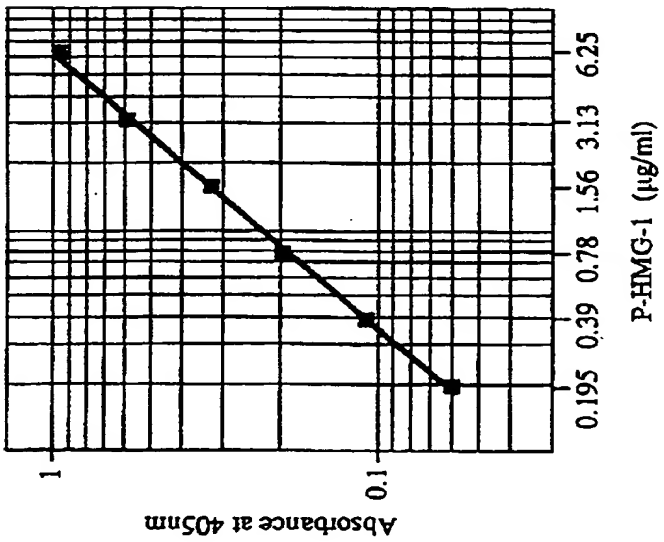
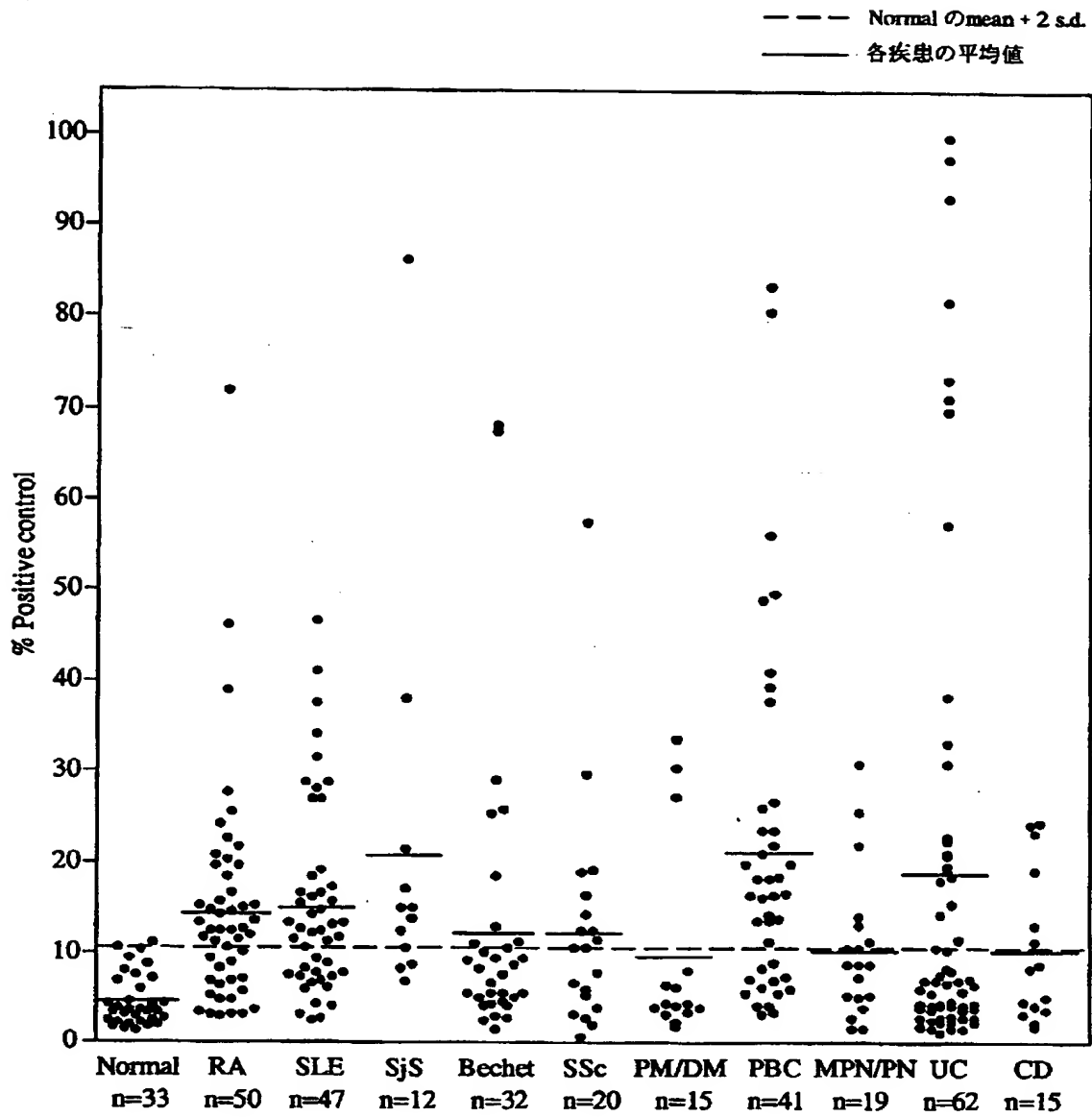


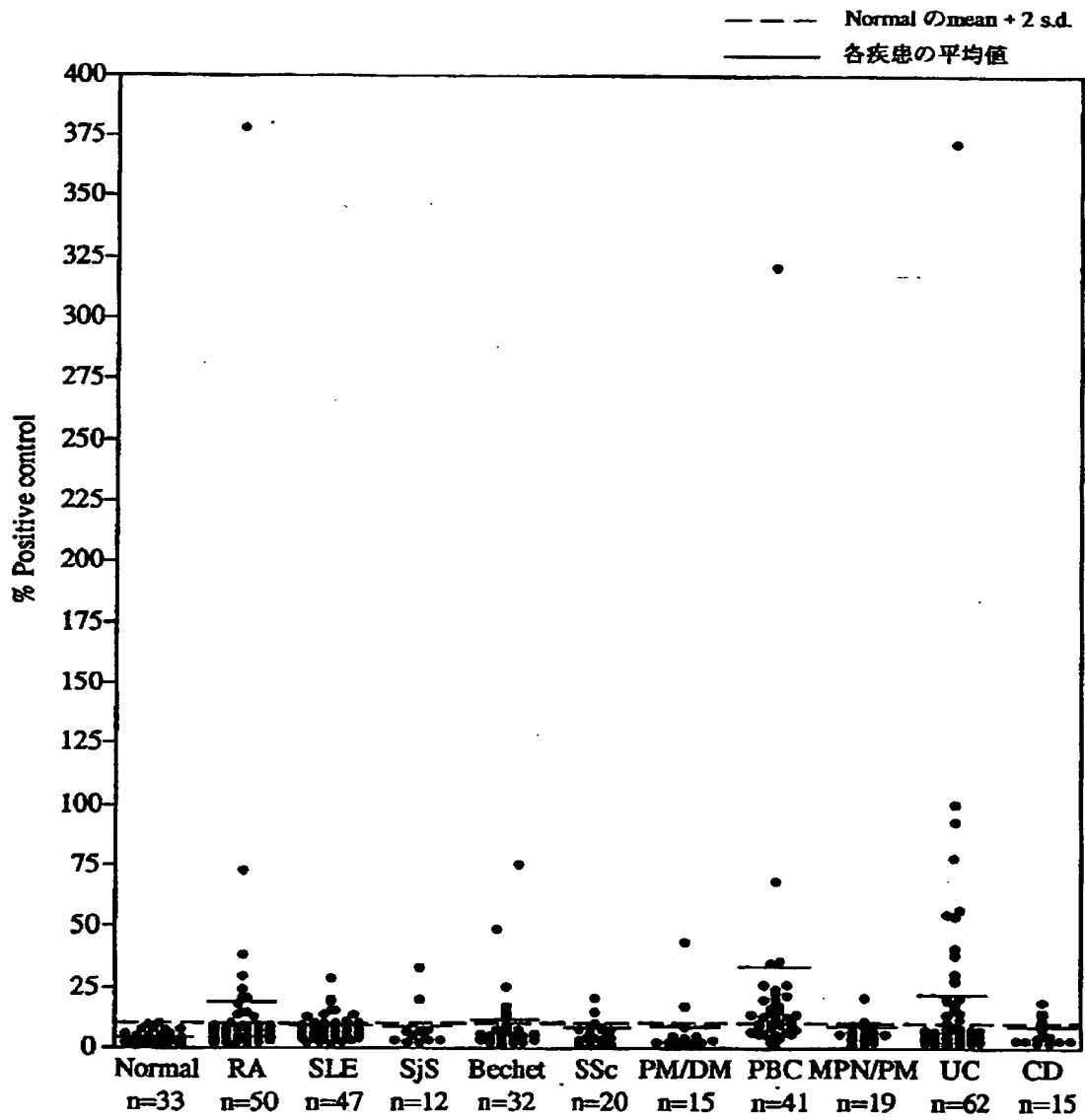
図10-1



【図 1 1】



【図 1 2】



【図13】

ヒト、ブタ、ウシおよびラットHMG-1のアミノ酸配列の比較  
ヒトと比較して同一アミノ酸を縦線で示してある。

ヒト	1	GKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREHHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ブタ	1	GKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREHHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ウシ	1	GKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREHHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ラット	1	GKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREHHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ヒト	51	MSAKEKGGKFEDMAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ブタ	51	MSAKEKGGKFEDMAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ウシ	51	MSAKEKGGKFEDMAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ラット	51	MSAKEKGGKFEDMAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ヒト	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACL	150
ブタ	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKHPYEKKAACL	150
ウシ	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACL	150
ラット	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACL	150
ヒト	151	KEYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDEEDEDEDEDEE	200
ブタ	151	KEYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDEEDEDEDEDEE	200
ウシ	151	KEYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDEEDEDEDEDEE	200
ラット	151	KEYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEDDEEDEDEDEDEE	200
ヒト	201	DEEDEDEEEDDDDE	214
ブタ	201	DEEDEDEEEDDDDE	214
ウシ	201	DEEDEDEEEDDDDE	214
ラット	201	EEEDEDEEEDDDDE	214

【図14】

ヒト、ブタ、ウシおよびマウスHMG-2のアミノ酸配列の比較  
ヒトと比較して同一アミノ酸を縦棒で示してある。

ヒト	1	GKGDPNKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSKKCSERWKT	50
ブタ	1	GKGDPNKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSKKCSERWKT	50
ウシ	1	GKGDPNKPRGKNSSYAFFVQTSREEHKKKHPDASVNF---S---ERWKT	50
マウス	1	GKGDPKPLGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPNSSVNFAEISKCSKRWKT	50
ヒト	51	MSAKEKSKFEDNAKSDKARYDRENKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ブタ	51	MSAKEKSKFEDNAKSDKARYDRENKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ウシ	51	MSAKEKSKFEDNAKSDKARYDRENKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
マウス	51	MSAKENSKFEDLAKSDKACYRENKNYVSPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ヒト	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGENTSEQSAKDKQPYEQKAAKL	150
ブタ	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGENTSEQSAKDKQPYEQKAAKL	150
ウシ	101	FFLFSAEHRPKIKAHPGLSIGDTAKKLGENTSQSAKDKQPYEQKASKL	150
マウス	101	FCLFCSENRPKIKIEYPGLSIGDTAKKLGENTSEQSAKDKQPYEQKAAKL	150
ヒト	151	KEKYEKDIAAYRAKGKSEAGKKGPGRPTGSKKKNEPEDEEEEEEE-DED	199
ブタ	151	KEKYEKDIAAYRAKGKGEAGKKGPGRPTGSKKKNEPEDEEEEEEEDED	200
ウシ	151	KEKYEKX-AAYRAKGKSEAGKKGPGRPTGSKKKNEPEDEEEEEEE.....	200
マウス	151	KEKYEKDFAAYRVKGKSEAGKKGPGRPAGSKKKNDSEDEEEEEEE-EED	199
ヒト	200	EEEEDEDEE	208
ブタ	201	EEEEDEDEE	209
ウシ	201	.....	
マウス	201	EEGEEDEDEE	208

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 自己免疫疾患患者を特異的に検出すること。

【解決手段】 HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する診断薬、診断キット、およびこれらを用いて自己免疫疾患患者の抗体を検出し得る。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000000941  
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100078282  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目2番27号 クリスタルタ  
ワー15階  
【氏名又は名称】 山本 秀策

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更新月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名 鐘淵化学工業株式会社